

ANNALES DE L'INSTITUT PASTEUR

UN MICROBE PATHOGENE POUR LES RATS

(*Mus decumanus* et *mus ratus*.)

Et son application à la destruction de ces animaux.

PAR J. DANYSZ.

(Laboratoire de microbie agricole de l'Institut Pasteur de Paris)

Depuis que Lœffler ¹ a fait connaître sa découverte du *bacillus typhi murium*, qu'il a isolé d'une épidémie spontanée de souris blanches, et qu'il a appliqué avec succès à la destruction des campagnols (*M. arvicola*), plusieurs autres bactériologistes ont observé des épidémies analogues et en ont isolé des microbes, morphologiquement identiques au bacille de Lœffler, mais plus ou moins virulents pour les différents genres ou espèces des petits rongeurs.

Le *bac. typhi murium* n'était franchement pathogène que pour les souris (*M. musculus*) et pour les campagnols (*M. arvicola*). Le bacille de Laser ² était pathogène pour le *M. agrarius*, celui de Merechkowski ³ pour les *Spermophiles*, et enfin celui de Issatchenko ⁴ pour les rats blancs.

De plus, chacun de ces divers bacilles passe par des virulences fort variables, de sorte que leur utilisation pratique pour la destruction des catégories de rongeurs auxquelles ils s'attaquent a rencontré de nombreuses difficultés. Il y aurait évidemment un grand intérêt, d'abord à étendre le champ d'action de l'un

1. *Centralbl. für Bakteriol.* 1892, nos 1 et 5.

2. *Ibid.* — 1892, p. 184.

3. *Ibid.* — Bd. XVII, p. 742.

4. *Ibid.* — Bd. XXIII, p. 873.

d'entre eux, en augmentant sa virulence et en le rendant ainsi capable de s'attaquer à d'autres espèces de rongeurs : puis, cette virulence augmentée, à la maintenir au niveau atteint. J'ai essayé de résoudre ce problème, et voici à quoi j'ai abouti jusqu'ici.

Un cocco-bacille présentant l'ensemble des caractères du *B. coli* et ressemblant en cela au bacille de Lœffler, isolé par moi d'une épidémie spontanée des campagnols, s'est montré dès l'origine un peu pathogène pour le rat gris (*M. decumanus*.)

Sur 10 individus nourris avec une culture de ce microbe, il en mourait, en moyenne, deux ou trois ; quelques autres devenaient malades, mais guérissaient ; d'autres enfin semblaient complètement réfractaires.

Le fait que, sur un certain nombre d'individus nourris avec ces cultures, il y en avait toujours un certain nombre qui succombaient, permettait d'espérer qu'il serait possible d'exagérer la virulence du microbe par les méthodes généralement usitées, c'est-à-dire par un certain nombre de passages de rat à rat.

Toutefois, un grand nombre d'expériences exécutées dans ce but ont montré bientôt que les passages successifs de rat à rat, aussi bien par ingestion que par injection sous la peau, finissaient toujours par affaiblir au lieu d'exalter la virulence du microbe donné par ingestion. On constatait toujours que, si la culture d'un premier passage tuait les animaux en 7 à 12 jours, et si le 2^e ou le 3^e passage se montraient généralement un peu plus virulents et tuaient en 5 à 10 jours, les cultures des passages suivants devenaient régulièrement de moins en moins pathogènes et finissaient toujours par ne plus tuer du tout.

Il était bien rarement possible de dépasser le 10^e ou 12^e passage : quelquefois la série s'arrêtait déjà au 5^e passage, ou même plus tôt, par la survie de tous les animaux mis en expérience.

Le résultat était exactement le même si, au lieu de faire alterner chaque passage par l'animal par une culture en bouillon ou sur gélose, on faisait manger aux animaux d'un passage les cadavres de ceux d'un passage précédent.

Il était donc certain que, dans l'évolution d'une épidémie causée par ce microbe, il fallait tenir compte, pour expliquer son extinction, non seulement de la résistance naturelle des

survivants, mais aussi d'une diminution indiscutable de la virulence du microbe.

L'expérience suivante en donne une preuve directe :

Un lot de 30 souris normales est placé dans une grande cage avec deux souris malades, un autre lot de 30 souris est réparti dans 6 bocalx différents et nourris avec la même culture que les 20 souris placées ensemble dans la cage avec les 30 normales.

Dans les 6 bocalx, toutes les souris sont mortes en 4 à 6 jours ; dans la cage, l'épidémie s'est déclarée 3 jours après la mort des deux premières souris malades, dont les cadavres ont été dévorés. Cette épidémie a duré 23 jours, 27 souris sont mortes, 3 ont survécu dans cette expérience, mais elles ont succombé un mois plus tard à la suite de l'ingestion d'une culture de virulence moyenne.

Ces trois souris n'étaient donc ni complètement réfractaires ni immunisées, leur résistance dans la première expérience ne peut être expliquée que par l'affaiblissement de la virulence du microbe dans la cage.

Comme le microbe est très peu toxique et ne tue qu'après avoir passé de l'intestin dans l'organisme où il finit par pulluler, il a semblé tout indiqué de chercher la principale cause de cet affaiblissement de virulence dans les changements des milieux que le microbe trouvait alternativement dans le tube digestif et dans le sang, et auxquels il devait s'habituer successivement en passant d'un animal à un autre.

Et, en effet, on observe d'une façon constante, d'une part qu'une augmentation de virulence pour le sang et les organes, obtenue par une longue série d'injections sous la peau, coïncide avec une diminution notable de la virulence du microbe de ces passages, pour le tube digestif ; d'autre part, on constate d'une façon tout aussi régulière que les microbes isolés du sang ou de la rate d'un animal, au moment où ils commencent à passer de l'intestin dans le sang, se montrent toujours plus virulents par ingestion que ceux que l'on isole après la mort de l'animal, c'est-à-dire après une culture plus ou moins longue dans les humeurs de l'organisme.

Il est à noter, enfin, que les passages des cultures en sacs de collodion enfermés dans le péritoine des rats, faites, soit en séries ininterrompues de sac à sac, soit en faisant alterner

chaque culture en sac par une culture en bouillon ou sur gélose, aboutissaient invariablement à un affaiblissement notable de la virulence pour le tube digestif.

Augmentation de la virulence et sa conservation. — M'inspirant des observations qui précèdent, et ayant constaté qu'un virus qui tuait les souris en 4 à 6 jours commençait à passer de l'intestin dans le sang et s'accumulait surtout dans la rate déjà 24 heures après l'ingestion, j'ai réussi à augmenter sa virulence et à le rendre régulièrement pathogène pour les rats, en suivant la méthode suivante :

Une culture en bouillon, isolée du sang d'une souris sacrifiée 24 heures après l'ingestion d'un virus mortel en 4 à 5 jours, est laissée 24 heures à l'étuve, réensemencée dans un nouveau bouillon et distribuée dans des ampoules aussi complètement remplies que possible.

Les ampoules sont tenues d'abord à l'étuve jusqu'au développement de la culture, et ensuite à la température ordinaire, jusqu'à formation d'un dépôt et clarification complète du bouillon, ce qui peut durer 4 à 5 jours et a pour but d'habituer le microbe à une vie sans air.

De l'ampoule on fait passer la culture dans un sac en collodion que l'on enferme pour 24 à 36 heures dans la cavité abdominale d'un rat, puis on la fait passer de nouveau dans du bouillon ordinaire, et de là encore dans des ampoules.

La culture de ces dernières ampoules estensemencée sur gélose, et c'est cette culture sur gélose que l'on donne, de nouveau, à manger aux souris, après l'avoir délayée dans l'eau et après en avoir imbibé du pain ou du grain.

On recommence plusieurs fois cette série d'opérations, et on constate déjà au quatrième ou cinquième de ces passages une augmentation de virulence très appréciable. Les souris, qui ne mouraient au début qu'en 4 à 7 jours, meurent 36 à 60 heures après l'ingestion.

Quand on a obtenu un tel résultat, on peut alors remplacer les souris par des rats blancs, en commençant par des jeunes rats âgés d'un mois à six semaines, et on continue les passages en prenant des rats de plus en plus âgés.

En procédant ainsi, et en faisant des cultures en sacs dans les cavités abdominales des espèces que l'on veut atteindre, on

peut spécialiser la culture et la rendre suffisamment virulente par une dizaine de passages.

C'est en opérant de cette façon que j'ai réussi à rendre régulièrement virulente d'abord pour les rats gris (*M. decumanus*), ensuite pour les rats noirs (*M. ratus*), et enfin pour le rat blanc, une culture qui à l'origine était très peu pathogène pour le rat gris et complètement inoffensive pour les deux autres.

Le bouillon dont je me suis servi est un bouillon de viande de cheval, peptonisé à 10/0, et additionné d'un peu de carbonate de chaux pour neutraliser les acides qui se forment pendant la culture et qui affaiblissent rapidement la virulence du microbe.

Enfermées dans des ampoules, à l'abri de l'air et de la lumière, ces cultures conservent leur virulence pendant plusieurs mois. Ensemencées sur gélose, elles se conservent sans variations appréciables pendant un à deux mois; en bouillon, dans des tubes ou flacons fermés avec du coton, elles s'altèrent très rapidement.

Ce sont ces cultures, relativement stables, que j'ai essayé d'employer pour la destruction en grand des rats dans les égouts et dans tous les locaux qu'ils infestent. Comme je l'ai dit plus haut, pour le développement des épidémies sur une population animale, il y a deux termes : le microbe pathogène et l'espèce dans laquelle il doit se propager. Nous savons que les diverses espèces de rats ne se ressemblent pas. On a vu aussi que les propriétés d'une même espèce de rats ne sont pas partout les mêmes, et dépendent dans une certaine mesure de leurs conditions d'alimentation. La question était de savoir quelle proportion de succès ou d'insuccès pouvait provenir de toutes ces causes de variation encore mal étudiées : il fallait consulter pour cela l'expérience.

Application dans la pratique. Résultats obtenus. — Les cultures amenées peu à peu à un degré de virulence permettant de tuer par ingestion tous les rats tenus en cage, au laboratoire, en 5 à 12 jours, ont servi en même temps à un grand nombre d'essais pratiques dans les fermes, magasins et autres locaux infestés par les rats.

De l'ensemble des rapports, se chiffrant par quelques centaines, que j'ai reçues à ce sujet, il résulte que, dans 50 cas sur 100, on constatait une disparition complète des rats, dans 20 cas

les résultats semblaient complètement négatifs, dans les 30 autres cas on constatait une diminution sensible des rongeurs dans les locaux traités.

Dans certains cas, assez rares, on a pu suivre l'extension de l'épidémie de la localité traitée à un certain nombre de localités voisines, non traitées.

Des observations de cet ordre sont intéressantes, mais elles ne permettent guère d'apprécier avec précision les effets réels de l'intervention. — Le nombre des malades et des cadavres que l'on trouve à découvert est relativement toujours très petit, et il est impossible de savoir si les rats disparus ont succombé à la maladie ou ont simplement émigré, fuyant devant l'épidémie.

Aussi, quand le service sanitaire de Paris s'est adressé à l'Institut Pasteur pour savoir s'il était possible de détruire les rats d'égouts au moyen d'une maladie contagieuse, j'ai cru qu'il fallait, avant de répondre, soumettre cette question à une étude spéciale.

J'ai demandé à l'ingénieur en chef, M. Bechmann, et à MM. les inspecteurs des égouts Masson et Delphini, de mettre à ma disposition un tronçon d'égout clôturé de tous les côtés, de façon que les rats ne puissent pas s'en échapper, abondamment fourni de paille et de nourriture, et d'introduire dans cet égout un nombre déterminé de rats vivants et bien portants pris dans des égouts voisins.

Ces conditions ayant été réalisées dans un tronçon d'égout de 460 mètres de long sur 3 mètres de large, l'expérience a donné les résultats suivants :

Le 2 février, 206 rats gris brun (*M. decumanus*) furent lâchés dans l'égout et laissés en observation pendant 10 jours.

Le 12 février, l'égout fut visité avec soin, tous les rats semblaient bien portants, on n'a trouvé aucun cadavre.

Le même jour on a distribué dans l'égout 20 tubes de culture sur du pain coupé en petits morceaux.

L'épidémie s'est déclarée le 20 février et on a fait alors une deuxième distribution de culture virulente.

Jusqu'au 2 mars l'égout fut visité chaque jour. On a trouvé en tout 80 cadavres de rats dont 40 furent autopsiés, les autres laissés sur place.

Les premiers ont montré tous, sans exception, des lésions

caractéristiques de la maladie (congestion de l'intestin, hypertrophie de la rate), et contenaient des cultures pures dans le sang; les rats laissés sur place ont toujours été dévorés du jour au lendemain par les survivants.

Le 2 mars, on n'a pu découvrir, malgré les recherches les plus minutieuses, qu'une grande quantité de débris informes ne permettant pas d'évaluer le nombre de rats dévorés, et 8 rats vivants qui ont fini par s'échapper par suite d'une négligence du surveillant.

Bien que l'expérience n'ait pu être suivie jusqu'à la fin, elle n'en montre pas moins d'une façon certaine que les rats en liberté dans les égouts mangent toujours très volontiers le pain trempé dans du bouillon de culture, malgré l'abondance d'autre nourriture (blé et carottes), qu'ils prennent la maladie et y succombent en grand nombre, et que les survivants dévorent les cadavres.

Il est donc très possible de créer à l'aide de cette culture des épidémies qui se propageront dans une certaine mesure.

La propagation de l'épidémie sera probablement assez limitée, elle s'arrêtera au 3^e ou 4^e passage par l'affaiblissement de la virulence du microbe, constaté toujours dans nos expériences relatées plus haut, et aussi par suite de la résistance plus grande d'un certain nombre des survivants. — Aussi, quand on veut détruire la grande majorité des rats qui infestent une localité, faut-il distribuer les cultures à plusieurs reprises, à 10 ou 12 jours d'intervalle, c'est-à-dire au moment où la distribution précédente aura déjà produit son effet.

L'époque de l'année à laquelle on doit de préférence appliquer ce traitement n'est pas non plus indifférente. Les jeunes rats sont beaucoup plus sensibles à l'action du virus que les rats âgés, les épidémies seront donc plus meurtrières au printemps (avril-mai-juin) et en automne (septembre à décembre) qu'aux autres époques de l'année.

En détruisant systématiquement, pendant une ou deux années de suite, les jeunes générations qui succombent toujours infailliblement, on finirait certainement par détruire les rats d'une façon complète.

Les expériences et essais faits simultanément à Lille par M. Calmette, directeur de l'Institut Pasteur de Lille; à Hambourg

par M. Abel, médecin sanitaire; à Copenhague par M. Th. Madsen; et à Tunis par M. Loir, directeur de la station bactériologique, ont donné à peu près les mêmes résultats qu'à Paris.

Les rats en cage ont toujours succombé 8 à 12 jours après une ingestion d'une culture, la grande majorité des essais en grand ont eu pour résultat une disparition plus ou moins complète des rats.

Le rapport que M. le Dr Abel a eu l'obligeance de m'adresser mérite d'être cité en entier.

« 1^o *Expérience de laboratoire.* — Quelques rats blancs et quelques rats gris brun capturés dans les égouts de Hambourg, enfermés dans des cages et nourris avec une culture reçue de l'Institut Pasteur de Paris, ont succombé en 6 à 12 jours. — A l'autopsie, — résultats positifs. »

M. Abel a isolé une culture de cette première expérience, et c'est avec cette culture réensemencée par lui qu'il a fait les deux essais suivants :

« 2^o *Station de désinfection à Hambourg.* — 10 cultures sur gélose.

« Résultats d'abord peu encourageants, on n'a trouvé que quelques souris mortes. Plus tard, sans trouver de rats morts, on a constaté une diminution de leur nombre.

« 3^o *Grand bateau à vapeur* (route d'Afrique orientale) 10 tubes de culture sur gélose.

« Aucun effet n'a été constaté. On n'a trouvé ni rats morts ni une diminution appréciable.

« Il n'y avait pas de souris sur le bateau. »

J'ai prié alors M. Abel de faire quelques nouveaux essais avec des cultures préparées à Paris et toutes prêtes à être employées.

« 4^o *Magasin d'entrepôt.* — 30 tubes de culture sur gélose.

« Quelques jours après la distribution on a trouvé un rat et deux souris mortes. — L'examen bactériologique a donné ses résultats positifs. Le douanier surveillant m'informe que le nombre de rats est plus restreint qu'avant l'emploi des cultures.

« 5^o *Grande écurie d'un voiturier,* beaucoup de rats et de souris. 50 tubes de culture sur gélose.

« Résultat excellent. Un rat noir (*M. ratus*) et une souris trouvés morts. Dans les cadavres examinés par moi, votre bacille a été trouvé en abondance. Lésions anatomiques typiques (tuméfaction des glandes de Peyer, hypertrophie de la rate, taches grises nécrotiques multiples dans le foie). On n'a pas trouvé d'autres cadavres, mais les rongeurs ont disparu complètement. Impossible de savoir s'ils sont morts ou s'ils ont émigré.

« 6^e *Petit hangar de la station de désinfection à Cuxhaven.* — Dix tubes de cultures sur gélose.

« Effet nul.

« Certainement, dit M. Abel, il n'est pas facile d'apprécier pourquoi les résultats avaient été si différents. Il me semble bien possible que ces différences dans les résultats obtenus sont dues en partie à la quantité des cultures employées, mais je ne puis pas en donner une preuve évidente.

« Il n'y a pas de doutes que la méthode donnera des résultats satisfaisants dans des conditions convenables, mais il est difficile de connaître ces conditions. »

Dans les chapitres précédents, j'ai déjà essayé de préciser les conditions qui me semblent les plus favorables pour le développement d'une épidémie parmi les rats, je n'y reviendrai donc pas ; j'ajouterai seulement que, pour chaque localité d'une certaine importance, la destruction des rats devrait faire l'objet d'une étude spéciale.

Les applications en grand devraient toujours être précédées de quelques expériences de laboratoire ayant pour but de montrer si la culture est pathogène pour la race des rats qu'il s'agit de détruire.

Dans l'affirmative, il serait toujours bon de renouveler et de spécialiser un peu la virulence de la culture, et c'est alors seulement qu'il faudrait l'appliquer d'une façon méthodique, aux époques où les jeunes générations des rats commencent à se montrer.

RECHERCHES EXPÉRIMENTALES SUR LE CHARBON SYMPTOMATIQUE

PAR MM. E. LECLAINCHE ET H. VALLÉE,

de l'École vétérinaire de Toulouse.

L'étude bactériologique du charbon symptomatique a fait déjà l'objet d'importants travaux.

En 1876, Bollinger¹, puis Feser² signalent la présence de bâtonnets mobiles dans les tumeurs crépitantes d'une affection « prétendue charbonneuse », mais différenciée déjà par la clinique du charbon bactérien, en raison de ses caractères particuliers ; tous deux concluent à la spécificité des microbes rencontrés, et ils obtiennent la transmission au bœuf et au mouton par l'inoculation des produits organiques virulents. En 1879, Arloing, Cornevin et Thomas précisent expérimentalement la distinction de la fièvre charbonneuse et du charbon emphysémateux ; en 1880, ils indiquent les principaux caractères de la bactérie pathogène (*Bacterium Chauvœi*) et ils signalent un premier procédé d'immunisation ; jusqu'en 1884, Arloing et Cornevin poursuivent l'étude de la maladie et ils font connaître une méthode de vaccination partout répandue à l'heure actuelle³.

Dès 1887, E. Roux⁴ obtient des cultures pures par l'ensemencement, dans le vide, sur gélose et en bouillon de veau.

Kitasato⁵ entreprend, en 1889, l'étude du *Bacterium Chau-*

1. BOLLINGER, Zur Kenntniss des sog. Geräusches, einer angeblichen Milzbrandform. (*Deutsche Zeitschrift für Tiermedizin*, t. I, 1875, p. 297.)

2. FESER, Studien ueber den sogenannten Rauschbrand des Rindes. (*Zeitschrift für prakt. Veterinärwiss.* t. IV, 1876, p. 43.)

3. Ces travaux sont réunis et complétés dans l'ouvrage suivant : ARLOING, CORNEVIN ET THOMAS. *Le charbon symptomatique du bœuf*, 2^e édition, 1887.

4. E. ROUX, Sur la culture des microbes anaérobies. (*Annales de l'Institut Pasteur*, t. I, 1887, p. 62.)

5. KITASATO, Ueber den Rauschbrandbacillus und sein Culturverfahren (*Zeitschrift für Hygiene*, t. VI, 188, p. 1057) ; Ueber das Wachsthum des Rauschbrandbacillus in festen Nährsubstraten. (*Id.*, t. VIII, 1890, p. 55.)

vari; il réalise la culture sur différents milieux et il analyse les propriétés biologiques du bacille et de la spore.

En 1888, E. Roux¹ démontre à la fois le rôle de la toxine dans la pathogénie et la possibilité de conférer l'immunité par l'inoculation de substances solubles.

Duenschmann² tente un peu plus tard de poursuivre cette étude; il signale les propriétés immunisantes du sérum fourni par les animaux rendus réfractaires à l'action du virus.

Enfin Kitt³ rapporte divers résultats concernant à la fois la culture de la bactérie, l'atténuation de la virulence et l'obtention de sérums immunisants.

Tous ces travaux ont éclairé puissamment déjà l'étude de la maladie; mais, en même temps que les connaissances devenaient plus précises, les incertitudes apparaissaient plus nombreuses et les contradictions devenaient plus évidentes. En ce qui concerne seulement des faits d'observation directe, comme les conditions de la culture de la bactérie ou la résistance du virus, les données publiées sont déjà dissemblables. D'autre part, les circonstances étiogéniques de la maladie ne sont que très imparfaitement connues.

En abordant à nouveau ce sujet, nous nous sommes proposés de reviser l'étude bactériologique du microbe et d'analyser le rôle respectif de la bactérie et de la toxine dans l'étiologie de l'infection.

PREMIÈRE PARTIE

LA BACTÉRIE DU CHARBON SYMPTOMATIQUE

Le virus que nous avons utilisé provient directement des lésions musculaires provoquées chez les bovidés par l'évolution accidentelle du charbon. Quatre virus de sources différentes se

1. E. Roux, Immunité contre le charbon symptomatique conférée par des substances solubles. (*Annales de l'Institut Pasteur*, t. II, 1888, p. 49.)

2. DUENSCHMANN, Etude expérimentale sur le charbon symptomatique. (*Annales de l'Institut Pasteur*, t. VIII, 1894, p. 403.)

3. KITT, Die Züchtung des Rauschbrandbacillus bei Luftzutritt (*Centralblatt für Bakter.*, t. XVIII, 1893, p. 468); Ueber Abschwächung des Rauschbrandvirus durch strömende Wasserdämpfe (*Id.*, t. III, 1888, p. 372 et 603); Serumimpfung gegen Rauschbrand (*Monatshfte für Thierheilkunde*, t. XI, 1899, p. 49).

sont comportés de façon identique et ont été indifféremment employés.

Il est difficile d'obtenir des cultures pures du bacterium Chauvœi. — La pulpe recueillie dans les tumeurs du charbon accidentel renferme presque toujours des microbes étrangers ; certaines d'entre les formes associées sont des anaérobies facultatifs sporulés que l'ensemencement à l'abri de l'air ou le chauffage ne parviennent point à éliminer. D'un autre côté, le virus ne peut être entretenu dans le laboratoire que par des passages de cobaye à cobaye et une nouvelle difficulté se présente :

L'infection par le charbon symptomatique favorise à un haut degré l'envahissement des tissus par le vibron septique ; au moment même de la mort, la présence du vibron est extrêmement fréquente, non seulement dans les tumeurs, mais encore dans le sang et dans tous les milieux. L'expérience nous a montré maintes fois qu'il est difficile d'obtenir une longue série de passages directs de cobaye à cobaye ; le plus souvent une souillure par le septique se produit et, après quelques passages, les animaux meurent à la fois septiques et charbonneux.

Après quelques passages successifs par le cobaye, il convient d'éprouver le virus par l'inoculation simultanément au lapin et au cobaye. Quand le cobaye seul est tué, onensemence directement quatre ou cinq gouttes de sang recueilli dans le cœur aussitôt après la mort.

La bactérie est strictement anaérobie. — Kitt n'a obtenu la culture qu'en plaçant le microbe dans des conditions de vie anaérobie, telles que les réalise l'ensemencement sous une haute colonne liquide, en grande partie purgée d'air par le chauffage.

Kitasato opère sous une atmosphère d'hydrogène. Nous préférons cultiver dans le vide. Les tubes en U de Pasteur chargés de bouillon ensemencé sont soumis à l'action d'une trompe métallique puissante, rincés à plusieurs reprises avec l'hydrogène ou le gaz d'éclairage purifié et scellés à la lampe sous le vide.

Milieux de culture. — Les bouillons de veau ou de poulet, additionnés de glycérine et de sulfate de fer, ou d'acide lactique, recommandés dans leur mémoire de 1887, par Arloing et Cornevin, n'ont donné aucune culture à Kitasato, sous atmosphère

d'acide carbonique ou d'hydrogène. En opérant dans le vide, avec des bouillons de veau additionnés de quantités croissantes de glycérine (2 à 5 0/0) et de sulfate de fer (1 à 10 0/00), en variant le degré d'alcalinité des milieux, nous n'avons constaté nous-même aucun développement.

Dans son premier mémoire, Kitasato montre que les milieux liquides conviennent le mieux pour la culture; il emploie de préférence les bouillons de cobaye, de veau, de lapin, de poule ou le bouillon de bœuf préparé avec de la viande fraîche; l'addition de sucre ou de glycérine n'exerce aucune action favorisante; si l'on veut conserver des cultures actives, il est indispensable de réensemencer chaque semaine en bouillon frais. Nos observations confirment tous ces points; nous avons constaté notamment que les cultures en bouillon de veau peptonisé à 1 0/0 restent assez pauvres et qu'elles perdent vite leur virulence.

Il est cependant nécessaire pour l'étude du charbon de posséder des cultures à la fois virulentes et toxiques : déjà Duenschmann s'était efforcé de trouver des milieux plus favorables. Le bouillon Martin ¹, stérilisé par filtration, présente tous les avantages désirables. La culture s'opère avec une remarquable abondance : après 12 à 15 heures, le liquide est fortement troublé et de fines bulles gazeuses montent sans cesse à la surface; après 24 heures, le bouillon est complètement opaque, et l'on distingue, par l'agitation, d'innombrables petits flocons blanchâtres, tandis que le dégagement gazeux s'opère avec intensité; après 36-48 heures, un dépôt blanc, grumeleux, occupe le fond des tubes, et le liquide est redevenu limpide.

Examinée après 12 heures, sans coloration, la culture montre de très nombreux bâtonnets mobiles, courts et de longueur égale. A ce moment déjà, on rencontre des bactéries déformées par la spore en fuseau ou en raquette. Après trois jours, on ne trouve plus guère que des formes sporulées. Après huit jours, le dépôt contient, avec de très rares bâtonnets, une quantité considérable de spores. Dès la 48^e heure, la culture est franche-

1. Nous utilisons le mélange à parties égales de la solution de peptone d'es-toumac de porc et du liquide de macération de viande de veau. (L. MARTIN, ces *Annales*, 25 janvier 1898, p. 26.)

ment acide et cette réaction se conserve ensuite indéfiniment.

Les cultures en bouillon Martin conservent leur virulence beaucoup plus longtemps que celles qui sont faites dans les bouillons ordinaires.

Exp. — Le même virus est ensemencé simultanément en bouillon-veau-peptone et en bouillon Martin. Après 15 jours, les cultures sont inoculées, en même temps, à des cobayes de poids égaux, à la dose de 1 c. c. La culture en bouillon de veau ne détermine qu'une réaction locale insignifiante. La culture en bouillon Martin provoque une tuméfaction crépitante, envahissante, et la mort en 40 heures.

La toxicité des cultures en bouillon Martin est supérieure de beaucoup à celle des autres. Alors que des filtrats en bouillon de veau ne tuent pas le cobaye à la dose de 20 c. c., nous avons obtenu, avec les cultures en bouillon Martin, des filtrats tuant le cobaye à la dose de 5 c. c. par injection dans le péritoine.

Morphologie. — Dans les tumeurs développées chez le cobaye au point d'inoculation, sont les bacilles, sporulés ou non suivant que l'évolution a été plus ou moins rapide. On s'explique que Kitasato ait pu nier la formation de la spore dans l'organisme. Chez des animaux tués très rapidement, la spore réfringente peut faire défaut ; on trouve seulement, avec les bâtonnets réguliers, des formes ovales, fixant également la matière colorante dans toute leur masse. Dans l'évolution habituelle, au contraire, les formes sporulées abondent dans les muscles envahis, mais la sérosité recueillie dans leur voisinage ne contient généralement que des formes bacillaires ou renflées, dépourvues de spores.

Les séreuses renferment des formes droites, moins trapues que celles des tumeurs, quelquefois réunies bout à bout, au nombre de trois ou quatre articles *de longueur égale*. Ces formes sont asporulées ; le chauffage des sérosités à 70°, pendant une demi-heure, les stérilise dans presque tous les cas.

Dans les cultures, on retrouve à la fois des bâtonnets réguliers et des bactéries diversement déformées par la spore réfringente.

Le *bacterium Chauvei* prend assez mal les couleurs d'aniline en solution aqueuse ; au contraire, il fixe avec intensité le violet phéniqué de Nicolle ; la bactérie traitée par la méthode de Gram-Nicolle reste colorée ; pour la recherche dans les tissus, la déco-

loration peut être poussée assez loin, si elle est pratiquée avec soin.

ÉTUDE DE LA VIRULENCE.

Cette étude a été réalisée avec des cultures en bouillon Martin dont la pureté a été toujours soigneusement contrôlée, notamment quant à la souillure par le vibron septique. On a eu recours, dans ce but, soit à de fréquentes inoculations d'épreuve au lapin, soit à l'immunisation préalable des cobayes de passages par un sérum immunisant à l'égard du vibron septique. Nous insistons à nouveau sur l'association du vibron septique au bacille du charbon symptomatique, car elle constitue la grosse difficulté de ces recherches; la plupart des expérimentateurs ont été victimes de cette superposition. On verra quel rôle cette cause d'erreur a joué dans l'appréciation des rapports existant entre le *bacterium Chauvœi* et le vibron septique.

Les cultures en bouillon Martin, âgées de 1 à 5 jours, tuent en 18 à 24 heures, à la dose de 3 à 4 gouttes, par inoculation intra-musculaire ou sous-cutanée, un cobaye du poids moyen de 500 grammes. Des doses de 1/2 à 1 c. c. tuent, dans les mêmes conditions, en 12 à 15 heures. La virulence ne diminue que très lentement ensuite; après 15 jours, le cobaye est encore tué sûrement par des doses moindres de 1 c. c.

L'inoculation intra-musculaire provoque le développement rapide de tumeurs emphysémateuses, identiques à celles qui sont consécutives à l'inoculation de sucs organiques virulents. Les cobayes meurent dans le coma, avec une hypothermie qui peut aller jusqu'au-dessous de 30° et même de 25°.

L'injection de 2-4 gouttes de culture dans le péritoine tue en 12 heures environ. Un exsudat séro-sanguinolent renferme quelques leucocytes et de nombreuses bactéries asporulées.

Le dépôt direct de 2-3 gouttes dans la masse des hémisphères cérébraux tue presque toujours en quelques heures, par intoxication directe, et avant qu'une pullulation ait eu le temps de s'opérer.

L'immunité naturelle du lapin n'est pas absolue. Certains animaux sont tués par l'injection, dans les muscles de la cuisse, de 2-4 c. c. d'une culture toxique, alors que d'autres, dans des

conditions identiques, résistent à l'épreuve. On ne peut s'expliquer ces variations que par des différences individuelles dans la réceptivité. La région inoculée est le siège d'une tumeur caractéristique; les muscles, de teinte foncée, sont livides, secs, spongieux; une sérosité gélatineuse, de couleur rouge, infiltre les interstices musculaires et le tissu conjonctif sous-cutané de la cuisse et de l'abdomen; les tissus dégagent une forte odeur acide de beurre rance. Ces lésions diffèrent totalement de celles qui expriment l'infection septique; d'ailleurs, les tissus ne renferment que des formes courtes filamenteuses ou sporulées, caractéristiques; les mêmes bactéries sont présentes sur le foie; l'inoculation des sérosités à des lapins neufs ne les tue pas, alors que les cobayes succombent à un charbon authentique. Enfin l'infection symptomatique et parfois obtenue, avec la culture, chez des lapins immunisés à l'égard du vibrion septique.

Le dépôt, dans le péritoine du lapin, de 3 c. c. d'une culture qui tue sous la peau à la même dose, laisse les sujets indifférents.

L'inoculation intra-veineuse tue en quelques heures, par intoxication; si la culture est très toxique, une dose de 2-3 c. c. tue en quelques minutes seulement. Le tableau suivant indique les résultats de quelques épreuves.

N ^{os}	Poids des lapins.	Quantité de culture injectée.	Age des cultures.	Mort après:
1	1.800 gr.	3 c. c.	11 jours. Conservé à l'étuve dans le vide. On injecte le liquide clair décanté.	5 minutes
2	1.680 —	2 c. c. 1/2		5 —
3	1.420 —	2 —		5 heures 1/2
4	1.800 —	3 —		4 —

Les effets ne peuvent être attribués au bouillon employé pour la culture; l'expérience montre que le lapin reçoit impunément 10 et 20 c. c. de bouillon dans la veine de l'oreille.

Les accidents débutent après 3 à 6 minutes; lors de mort immédiate, l'animal rejette brusquement la tête en arrière; il tombe sur le côté; on note des hoquets, de la chorée du diaphragme, quelques cris, de l'agitation convulsive des membres; la mort survient 2 ou 3 minutes après le début des accidents. En d'autres cas, les accidents apparaissent après 6 ou 8 minutes seulement; l'on constate de la parésie, puis de la paralysie du

train postérieur, une résolution musculaire complète, de l'accélération de la respiration et de la diarrhée. Cet état persiste pendant plusieurs heures; la température s'abaisse à 35-34° et la mort arrive après 4-5 heures environ. Parfois enfin, on observe seulement de l'engourdissement, puis un état comateux de plus en plus grave et les animaux meurent après 12-24 heures, sans que des symptômes bruyants aient été relevés.

Lors d'évolution ralentie (mort après 24 heures), il existe des lésions très nettes d'intoxication: les séreuses ecchymosées renferment des exsudats séro-sanguins; le foie est friable, de teinte jaune; le myocarde est cuit et couvert d'ecchymoses. Les exsudats des séreuses montrent une quantité considérable de bactéries asporulées.

Ainsi, l'inoculation des cultures provoque tantôt une évolution virulente, tantôt des accidents immédiats qui ne peuvent être rapportés qu'à une intoxication rapide.

Les deux ordres d'accidents peuvent être expérimentalement dissociés: on verra que chez le cheval, animal peu sensible à l'action du virus, les cultures injectées dans les veines déterminent des symptômes d'intoxication; d'autre part, les cobayes immunisés par le sérum à l'égard du virus restent sensibles à l'influence de la toxine.

ÉTUDE DE LA TOXICITÉ

Les expériences de Roux ont établi la faible toxicité des cultures en bouillon de veau chauffées à 115°. Les milieux albumineux de Duenschmann donnent des résultats plus satisfaisants; ses extraits filtrés de culture en purée de viande tuent à la dose de 5. c. c.

Le bouillon Martin,ensemencé avec une bactérie très active provenant directement de l'organisme, donne une culture qui devient rapidement toxique. L'épreuve des cultures totales, non chauffées, pratiquée par l'inoculation dans la veine du lapin ou dans le cerveau du cobaye, montre que la toxicité, déjà manifeste après 48 heures, atteint son énergie maxima vers le cinquième jour, pour décroître ensuite assez rapidement.

On peut présumer des effets de la toxine par les suites immédiates de l'inoculation des cultures non filtrées, mais

simplement décantées ; il est vraisemblable que c'est la toxine qui tue en quelques minutes les lapins inoculés dans les veines. Chez le cheval aussi, l'inoculation intra-veineuse des cultures décantées provoque souvent des accidents graves, immédiats, et même la mort :

EXP. — 15. XI. 99. Cheval morveux, taille moyenne, reçoit dans la jugulaire 10 c. c. d'une culture âgée de 8 jours. Trois minutes après l'injection, tremblements généralisés, respiration haletante, chute; mort en six minutes.

18. XI. 99. Cheval de taille moyenne, reçoit dans la jugulaire 18 c. c. d'une culture âgée de 11 jours ; après deux minutes, respiration sifflante, défécations répétées, tremblements musculaires. Les accidents persistent pendant 1 2 heure, puis ils s'atténuent et disparaissent progressivement en quelques heures.

Six jours après, le cheval reçoit 12 c. c. d'une culture âgée de 5 jours ; après 4 minutes, respiration haletante, hoquets, chute ; défécations répétées ; contractions des muscles du cou ; bâillements ; mort en 5 minutes.

La filtration seule permet d'isoler la toxine, mais les filtres retiennent une grande partie du poison, car les filtrats sont toujours notablement moins actifs que la culture entière.

EXP. I. — Un lapin de 1,800 grammes reçoit, dans la veine de l'oreille, 3 c. c. d'une culture totale de 5 jours ; il est tué en 15 heures, après avoir présenté les signes d'intoxication déjà signalés.

Un lapin de même poids reçoit 10 c. c. de la même culture après filtration ; il ne présente aucun accident.

EXP. II. — Un lapin de 1,600 grammes reçoit dans la veine 2 c. c. d'une culture de 18 heures ; état comateux après 5 à 6 minutes ; diarrhée ; mort en 10 heures.

Un lapin de même poids reçoit 6 c. c. de la même culture filtrée, aucun accident.

EXP. III. — Cobaye 171 ; 970 grammes. Reçoit dans le cerveau trois gouttes d'une culture de 18 heures. Après 5 minutes, hoquets, étternuements, chute, contractions des membres, puis coma ; mort en 4 heures 30. —

Cobaye 173 ; 840 grammes. Reçoit trois gouttes de la même culture dans le cerveau. Après 10 minutes, hoquets, étternuements, agitation ; paralysie progressive du train postérieur ; contractions cloniques des muscles, chorée du diaphragme ; tombe sur le dos ; respiration accélérée. Température initiale 38°5 ; après 3/4 d'heure 35°5. Mort en 5 heures.

Cobaye 174 ; 800 grammes. Reçoit trois gouttes de la même culture, filtrée sur filtre Chamberland. Aucun accident immédiat. Etat comateux progressif ; température normale après une heure. Mort dans le coma en 18 heures.

Cobaye 175 ; 800 grammes. Reçoit 3 gouttes de bouillon Martin dans le cerveau. Aucun accident.

L'étude comparée d'une série de cultures toxiques dans un même bouillon, à différents âges, filtrées et non filtrées, montre que la filtration altère surtout les propriétés des cultures jeunes. On peut admettre que la toxine reste adhérente aux corps microbiens pendant la pullulation bactérienne; sa diffusion s'opérerait partiellement par la dissolution des bactéries lors de la sporulation; or, celle-ci est complète vers le cinquième jour et c'est à ce moment que les filtrats possèdent leur toxicité maxima.

Comme pour les cultures entières, on constatera des différences marquées dans l'activité des filtrats suivant la qualité du bouillon ou les propriétés du microbe ensemencé. Nous obtenons des filtrats tuant le cobaye, dans le péritoine, à la dose de 5 c. c., tandis que les lapins succombent en quelques instants à une inoculation intra-veineuse de 3 c. c.

EXP. — Cobaye 54; 515 grammes, température 37°,5. Reçoit dans le péritoine 6 c. c. d'une culture filtrée âgée de 5 jours. Etat comateux progressif; poil hérissé; diarrhée. Température après une heure, 35°,3. Mort en 10 heures. — Cobaye 112; 320 grammes, température 38°,2. Reçoit dans le péritoine 5 c. c. d'une culture filtrée âgée de 5 jours. Mêmes symptômes que ci-dessus. Température après 2 heures, 30°,4; après 5 heures, 29°,8; après 6 heures, 26°. Mort en 7 heures. — Cobaye 129; 530 grammes; température 39°,5. Reçoit dans le péritoine 10 c. c. d'une culture filtrée âgée de 5 jours. Douleurs abdominales; puis coma. Température après 2 heures, 33°,4; après 5 heures 33°,2; après 7 heures 33°,5. Mort en 12 heures.

Lapin; 1,750 grammes. Reçoit dans la veine de l'oreille 3 c. c. 1/2 d'une culture filtrée âgée de 5 jours. Convulsions, paraplégie, spasme laryngien. Mort en 5 minutes.

Les cobayes qui reçoivent de faibles doses ou des filtrats moins toxiques ne présentent que des accidents atténués: somnolence, poil hérissé, diarrhée, hypothermie passagère de 2 à 3°. Ils succombent dans un état d'émaciation et de cachexie extrêmes, après un délai ordinaire de 7 à 9 jours; sur un total de 31 cobayes inoculés, deux seulement ont présenté une survie de 14 et de 23 jours.

Le tableau suivant indique les diverses variétés de l'intoxication; les pertes de poids constatées sont des plus remarquables.

	Culture filtrée âgée de	Quantité inoculée	Survie de	Poids			Perte de poids
				Initial	après 48 heures	à la mort	
Cobaye 161	3 jours	5 c.c.	8 jours	370	305	215	155 gr.
— 163	3 —	5 —	8 —	310	260	185	125 —
— 169	8 —	6 —	7 —	340	270	190	150 —
— 170	8 —	5 —	23 —	300	240	200	100 —
— 180	5 —	5 —	14 —	415	»	170	245 —

L'action de la toxine est encore mieux démontrée par l'inoculation de cultures virulentes, chez des sujets rendus réfractaires au virus par le sérum de cheval immunisé. Tous les cobayes inoculés succombent en 15-30 jours en moyenne, considérablement amaigris. Le sérum, puissamment antivirulent, ne préserve pas contre la toxine; les traités meurent dans les mêmes conditions que les sujets qui reçoivent une faible quantité de toxine pure.

La toxine est altérée au contact de l'air; une culture soumise à une large aération pendant 48 heures perd ses propriétés toxiques.

Par contre la toxine est très résistante à l'action de la chaleur; comme E. Roux l'a montré, elle n'est pas encore détruite après chauffage à 115°; le chauffage à 70-75° pendant deux heures modifie seulement ses propriétés chimiotaxiques: de négatives qu'elles étaient, elles deviennent positives; il est facile de s'en assurer en introduisant sous la peau ou dans le péritoine de lapins ou de cobayes, de petits tubes capillaires ouverts à une extrémité et contenant les uns du filtrat frais, les autres le même filtrat préalablement chauffé.

L'expérience suivante prouve que la toxine est encore capable de tuer après un chauffage à 115° pendant dix minutes, mais que ses propriétés sont fortement atténuées.

Exp. — Cobaye 142; 250 gr. Reçoit 5 c. c. dans le péritoine du filtrat d'une culture âgée de 5 jours. Température initiale, 38°,3; après 1 heure, 30°, 1. Mort en 10 heures environ.

Cobaye 143; 250 gr. Reçoit 8 c. c. dans le péritoine du même filtrat chauffé. Température initiale, 38°,3; après 4 heures, 32°,9; paraît rétabli le lendemain. Meurt cachectique en 8 jours.

Les effets physiologiques de la toxine sont tout différents suivant la dose inoculée et le mode de la pénétration.

L'intoxication rapide semble être la conséquence d'une fixation instantanée du poison sur certains éléments et notamment sur les centres nerveux. L'analyse des accidents observés lors d'inoculation directe dans le cerveau indique un envahissement progressif des hémisphères et de la moelle allongée.

Le cobaye et le lapin, inoculés dans les parties antérieures du cerveau, présentent toujours de la polyurie et de la glycosurie.

Dans l'intoxication aiguë, les accidents dominants sont le coma et l'hypothermie; ils reproduisent les phénomènes généraux de la maladie naturelle chez les bovidés, lors d'évolution rapide.

Lors d'intoxication lente, on note seulement de l'amaigrissement, de l'émaciation et un état de cachexie progressive avec terminaison constante par la mort.

RÉSISTANCE DU VIRUS

Il existe des dissidences quant à l'appréciation du degré de résistance du *virus frais*¹ à l'action de la chaleur.

Arloing et Cornevin enferment du virus frais dans de petits tubes scellés à la lampe qu'ils portent à l'étuve à des températures variables entre 60 et 80°; ils constatent que le virus ne tue plus le cobaye après chauffage à 70° pendant deux heures vingt minutes ou à 80° pendant deux heures; chauffé seulement à 65°, pendant une heure dix minutes, il tue encore le cobaye en quarante-cinq heures.

Kitasato prétend que le jus, recueilli frais et desséché aussitôt, perd toute action après un chauffage de vingt minutes à 65°. D'après lui, la sporulation ne s'opère pas dans les tissus vivants; on ne rencontre dans ceux-ci que des bacilles réguliers ou des formes renflées contenant des corpuscules réfringents, facilement colorables par les procédés ordinaires. Ces renflements ne constituent pas des spores vraies; celles-ci se forment seulement dans les cadavres ou dans les produits organiques recueillis. Ainsi, la sérosité virulente desséchée, 48 heures après

1. Avec MM. Arloing et Cornevin, nous désignons sous l'expression de *virus frais* le suc obtenu par la trituration et la compression des tissus compris dans la tumeur symptomatique.

la mort, et la viande conservée en gros morceaux résistent à l'action du chauffage dans les mêmes conditions ¹.

On ne saurait, pour juger la conservation de la vitalité, se contenter de l'épreuve par l'inoculation au cobaye. On peut admettre que le chauffage altère ou détruit la virulence sans modifier cependant la vitalité du virus — et l'on verra plus loin que cette hypothèse est fondée. Il faut de toute nécessité recourir à l'ensemencement.

Chez un grand nombre de cobayes, on recueille, aussitôt après la mort, le jus des tumeurs musculaires et la sérosité épanchée dans le tissu conjonctif des parties voisines. Avec ce produit, on remplit de petites ampoules qui sont scellées, puis chauffées au bain-marie, à 63°, pendant une demi-heure. Les liquides chauffés sont ensuite en partie inoculés et en partie ensemencés en bouillon Martin.

Les résultats obtenus par cette méthode sont variables : alors que les jus de muscles ont toujours conservé leur vitalité et leur virulence, qu'ils poussent en culture et qu'ils tuent les cobayes inoculés, les sérosités cultivent et tuent en certains cas, tandis qu'elles restent stériles et inoffensives en d'autres.

L'analyse bactériologique fournit une explication de ces faits. Alors que le jus de muscle renferme toujours des bactéries pourvues de spores réfringentes, les sérosités en sont ordinairement dépourvues. On n'y rencontre que des bacilles réguliers, ou encore des formes renflées en fuseau, fixant avec intensité le colorant ; la résistance de ces formes, qui correspondent sans doute aux premières phases de la sporulation, paraît être très variable. Chez un même sujet, on constatera ainsi la résistance au chauffage du jus de muscle, alors que la sérosité sera stérilisée.

Ces résultats permettent d'interpréter les constatations faites par Kitasato. Suivant le procédé de récolte employé et suivant la rapidité de l'évolution et de la sporulation dans les tissus, les effets du chauffage se montrent dissemblables.

Arloing et Cornevin ont observé que le virus desséché est plus résistant que le virus frais à l'action de la chaleur. Ils ont établi aussi que la chaleur sèche (air chaud) et la chaleur

1. Voir à ce sujet la critique du premier mémoire de Kitasato par M. Metchnikoff, in *Annales*, t. III, 1889, p. 331.

humide (vapeur d'eau) agissent différemment pour une même température. Nous avons constaté également que le jus de muscle desséché, préparé suivant le procédé d'Arloing, résiste à un chauffage dans l'air sec à 104° pendant 7 heures. Le même produit chauffé à l'autoclave, à la même température, pendant dix minutes, a complètement perdu sa virulence et sa vitalité.

Dans les bouillons, la résistance des spores est variable suivant l'âge des cultures. Les cultures âgées de 24 heures restent vivantes après un chauffage à 58-60° pendant un quart d'heure; elles sont tuées en une demi-heure à 70°. Après 48 heures, la culture résiste au chauffage à 70° pendant une demi-heure. Après quatre jours, la résistance a atteint son maximum, le chauffage à 80° pendant 2 heures laisse intacte la vitalité de la spore. A une température de 100°, la spore est détruite en quelques minutes; elle résiste à 90-95 pendant une demi-heure.

Ces données s'appliquent au développement régulier habituel des cultures en bouillon Martin. Toutes les circonstances qui retardent la sporulation modifient la résistance de la bactérie au chauffage; ainsi une culture âgée de 48 heures, renfermant des spores incomplètement formées, a été stérilisée en une demi-heure à 70°.

DEUXIÈME PARTIE

ÉTIOLOGIE

Les belles recherches de Vaillard et de ses élèves sur l'infection tétanique ont élucidé le difficile problème de l'étiogénie en précisant les conditions nécessaires à la germination de la spore. On sait que Besson a appliqué les mêmes méthodes et constaté les mêmes faits en ce qui concerne le vibrion septique.

Ne retrouverait-on pas dans le charbon symptomatique les mêmes circonstances étiologiques? Il s'agit ici encore d'une infection provenant directement des sols, ne se produisant que sous certaines conditions de réceptivité et causée par un microbe à spores. Les analogies existant entre cette affection et la septicémie gangréneuse tendent encore à appuyer cette hypo-

thèse. Enfin certains des résultats expérimentaux déjà publiés sont étranges, contradictoires et les interprétations tentées sont manifestement insuffisantes.

LES SPORES SANS TOXINE NE TUENT PAS

Les données précédentes montrent que la spore adulte résiste pendant plusieurs heures à des températures comprises entre 80 et 85°, que la toxine est modifiée par le chauffage à 75°, au point de perdre ses propriétés chimiotaxiques négatives. Il devient ainsi possible de débarrasser la spore de la toxine adhérente.

Des cultures en bouillon Martin, âgées de 5 jours au moins, sont chauffées en ampoules pleines, scellées, au bain-marie, à des températures comprises entre 75 et 85°, pendant des temps variables.

Les cultures chauffées à 75° pendant 2 heures sont irrégulières dans leurs effets; elles tuent parfois les animaux sans retard appréciable dans l'évolution. Après 2 heures de chauffage à 78°, ou une heure à 80-85°, les inoculations restent très généralement sans effet. Enfin, les cultures chauffées à 85° pendant 2 heures, ou à 80° pendant 3 heures, ne tuent en aucun cas les cobayes inoculés.

On peut inoculer impunément des quantités considérables de spores chauffées. Pour obtenir les spores en très grand nombre, nous recommandons la technique suivante : les cultures sporulées donnent après 3 jours un dépôt abondant ; on décante alors le liquide épuisé par la culture et on le remplace par du bouillon neuf ; une pullulation nouvelle s'opère, suivie d'un nouveau dépôt ; si l'on renouvelle à deux reprises la même opération, on voit au fond des tubes un épais dépôt constitué par des millions de spores accumulées. On agite alors les tubes, et leur contenu réparti en ampoules est chauffé à 80° pendant 2-3 heures. Des numérations, par ensemencement de dilutions successives en gélatine et gélose, montrent qu'on peut évaluer approximativement à 5 millions le nombre des spores contenues dans un centimètre cube du dernier bouillon utilisé.

Les inoculations intra-musculaires de 1/2 à 1 c. c. de cette culture chauffée ne provoquent aucun accident.

Quarante cobayes pesant de 170 à 700 grammes ont résisté à l'inoculation.

Exp. — Cobaye 35 ; 400 grammes ; 1/2 c. c. culture chauffée 2 heures à 80° (environ 3,000,000 de spores) ; œdème local à peine sensible. Survit.

Cobaye 116 ; 270 grammes ; 1 c. c. culture chauffée 3 heures à 80°, aucun accident (5,000,000 de spores).

Cobaye 122 ; 400 grammes ; 1 c. c. culture chauffée 2 heures à 80° (5,000,000 de spores), un peu d'œdème local. Survit.

On peut se demander jusqu'à quel point les masses de spores injectées sont tolérées par l'organisme. Le cobaye peut supporter jusqu'à 4 c. c. de bouillon chauffé, soit 20 millions de spores.

Exp. — Cob. 165 ; 330 grammes. Reçoit 3 c. c. d'une culture chauffée 3 heures à 80°. Aucun accident local. Survit.

Cob. 166 ; 270 grammes ; 4 c. c. de la même culture, soit environ 20 millions de spores, pas d'accident local grave. Survit.

Cob. 167 ; 400 grammes ; 3 c. c. même culture. Survit.

Toutefois, l'innocuité de doses aussi considérables n'est plus certaine. Dans l'expérience ci-dessus, un cobaye qui reçoit 3 c. c. de la culture chauffée meurt en 18 heures, avec des lésions caractéristiques.

L'inoculation des spores pures dans le péritoine se montre également inoffensive. Le cobaye reçoit ainsi jusqu'à 3 c. c. sans éprouver aucun trouble.

Les spores provenant de cultures chauffées ont conservé toute leur vitalité ; *ensemencées, elles donnent des cultures très virulentes* ; cependant elles ne germent pas dans les tissus. L'innocuité de la spore pure ne tient point à une atténuation de sa virulence, car les cobayes qui en ont reçu de grandes quantités ne possèdent dans la suite aucune immunité.

Si, 12 à 15 heures après la pénétration des spores, on recueille, dans le petit foyer inflammatoire développé au niveau du point d'inoculation, une trace de l'exsudat, on y rencontre de très nombreux leucocytes accumulés. Après coloration par la fuchsine de Ziehl, décoloration à l'alcool et recoloration au bleu de méthylène, on voit que toutes les spores ont été ingérées par les leucocytes. Certains phagocytes littéralement bourrés renferment jusqu'à 12 ou 15 spores. Les rares spores non incluses

ont été libérées par l'écrasement de quelques leucocytes lors de la fixation ; aucune n'a donné de mycélium. Après 48 heures il n'existe plus localement qu'une petite nodosité légèrement densifiée ; les leucocytes rencontrés à ce niveau sont granuleux, vacuolaires ; on n'y distingue plus de spores colorables. Le noyau induré du point d'inoculation disparaît du quinzième au vingtième jour.

Lors d'inoculation intra-péritonéale, les spores pures sont très rapidement englobées par les leucocytes ; il est facile de suivre les phases de la phagocytose par des prélèvements répétés d'une petite quantité d'exsudat péritonéal.

LES SPORES GERMENT LORSQU'ELLES SONT PROTÉGÉES CONTRE LES PHAGOCYTES

Ainsi la phagocytose triomphe rapidement de la spore dépourvue de toxine. Si la protection contre les phagocytes est véritablement liée à la présence de la toxine, on doit rendre sa virulence à la spore en lui restituant la toxine. D'autre part si l'infection n'est possible qu'en l'absence de la phagocytose, la spore dépourvue de toxine, mais protégée contre les phagocytes, doit germer, donner de la toxine et provoquer l'évolution virulente.

a) *Restitution de la toxine à la spore.* — La spore chauffée est impuissante, bien que vivante et non atténuée. Si, à une dose certainement inoffensive de spores pures, on ajoute une certaine quantité de toxine, les spores germent dans les tissus et provoquent une infection typique.

Exp. — Cob. 72 ; poids 500 grammes ; reçoit 1/2 c. c. d'une culture chauffée pendant 2 heures à 80°, additionnée d'un c. c. de toxine, dans les muscles de la cuisse. Meurt en 48 heures, avec tuméfaction considérable.

Cobaye 123 ; poids 400 grammes ; reçoit 1 c. c. spores pures, additionné de 3 c. c. de toxine, dans les muscles de la cuisse. Tuméfaction énorme après 15 heures. Mort en trente heures.

Cobaye 124 ; poids 600 grammes. Reçoit 1 c. c. spores pures, additionné de 3 c. c. toxine, dans les muscles de la cuisse. Tuméfaction très étendue après 12 heures, mort en 30 heures.

Cobaye 137 ; 630 grammes. Reçoit dans les muscles de la cuisse 1/2 c. c. spores pures, additionné de 2 c. c. toxine ; mort en 40 heures.

Dans tous les cas, les témoins inoculés avec des doses égales

ou supérieures de spores pures restent complètement indemnes.

Une dose assez forte de culture filtrée est nécessaire pour assurer l'infection. Il ne suffit pas de restituer aux spores débarrassées de toxine une quantité de filtrat égale en volume à la quantité de culture virulente strictement suffisante pour tuer. C'est qu'en effet le filtre retient une forte proportion du poison. La dose minima nécessaire, évidemment variable suivant la richesse en toxine du bouillon filtré, correspond en moyenne à 1 c. c.

b) *Addition d'acide lactique.* — La restitution de la toxine a eu pour effet de modifier complètement les conditions de la phagocytose. Protégées contre les phagocytes par les propriétés chimiotaxiques négatives de la toxine, les spores germent sur place et l'infection s'opère. Si cette interprétation est exacte, toutes les influences capables d'enrayer la phagocytose devront permettre à la spore de manifester sa virulence.

On sait que l'acide lactique favorise puissamment l'infection par le *Bacterium Chauræi*. Un virus atténué, additionné d'acide lactique, tue comme un virus fort; dans les mêmes conditions un virus normal tue les animaux réfractaires comme le lapin. Arloing et Cornevin croient à une exaltation de la virulence; Nocard et Roux montrent qu'en réalité le virus n'est point exalté, mais que les tissus modifiés deviennent incapables d'entraver la germination des spores. « Toute action qui diminuera la vitalité des tissus... facilitera le développement des germes en affaiblissant la concurrence des cellules et paraîtra ainsi leur restituer la virulence. » En dehors de l'acide lactique, l'acide acétique, le lactase de potasse... le simple traumatisme exercent la même action. Vaillard et Vincent constatent que l'acide lactique exerce une action répulsive sur les leucocytes; Massart et Bordet démontrent complètement ses propriétés chimiotaxiques négatives.

Pour la bactérie du charbon symptomatique comme pour le bacille du tétanos, l'acide lactique agit en empêchant la phagocytose; il suffit d'ajouter la spore pure d'une faible quantité d'acide lactique pour provoquer un magnifique charbon expérimental. Des spores données impunément par millions tuent à des doses dix fois plus faibles si on y ajoute une goutte d'acide lactique.

Exp. — Cobaye 94; poids 240 gr. Reçoit dans les muscles de la cuisse 1 c. c. spores pures; ne présente qu'une réaction locale bénigne. Survit.

Cob. 95; 240 gr. Reçoit dans les muscles de la cuisse 1/8 de c. c. des spores inoculées au cobaye 94, additionnées d'une trace d'acide lactique; meurt en 18 heures.

Cob. 122; 400 gr. Reçoit dans les muscles de la cuisse 1 c. c. spores pures. Survit.

Cob. 126; 690 gr. Reçoit dans les muscles de la cuisse 1/4 c. c. spores pures et une trace d'acide lactique. Meurt en 24 heures.

Cob. 166; 270 gr. Reçoit dans les muscles de la cuisse 4 c. c. spores pures. Survit.

Cob. 168; 470 gr. Reçoit dans la cuisse 1/8 c. c. spores inoculées au cobaye 166 et une trace d'acide lactique. Meurt en 26 heures.

Nous avons montré déjà que les propriétés des spores n'étaient nullement modifiées par le chauffage. Les expériences comparatives montrent qu'après l'addition d'acide lactique la spore pure tue aussi vite que la culture fraîche dont elle est issue.

Exp. — Cob. 135; 720 gr. Reçoit dans les muscles de la cuisse 1/2 c. c. culture fraîche, 24 heures.

Cob. 136; minutes 690 gr. Reçoit dans les muscles de la cuisse 1 c. c. même culture, chauffée 25, à 80°. Survit.

Cob. 141; 780 gr. Reçoit dans la cuisse 1/2 c. c. de spores pures, additionnées d'une trace d'acide lactique. Mort en 24 heures.

c) *Procédés mécaniques.* — D'autres méthodes d'ailleurs permettent d'enrayer la phagocytose. Il suffit d'associer la spore pure à des corps pulvérulents inertes pour lui assurer une protection suffisante. La culture chauffée est versée sur du sable stérile très fin. On évapore rapidement à 38° et on brise en petits fragments la masse granuleuse obtenue. Toutes ces manipulations doivent être faites aseptiquement.

Si l'on introduit purement ces agglomérats sableux sous la peau de cobayes, on voit presque toujours le charbon évoluer. Les spores réparties à la surface des amas sableux sont atteintes et ingérées par les phagocytes; mais celles qui sont incluses dans le centre de la masse, momentanément à l'abri des cellules, germent dès qu'elles sont imprégnées par les sucs organiques. On s'explique que l'infection soit d'autant plus certaine que les masses introduites, plus volumineuses et moins friables, ont assuré à la spore une protection plus complète et plus durable.

Exp. — Cob. 87; 500 gr. Reçoit sous la peau 1/4 c. c. de culture chauffée à 80°, desséchée sur sable; meurt du charbon en 4 jours.

Cob. 106; 480 gr. Reçoit sous la peau 1/2 c. c. culture chauffée desséchée sur sable; meurt en 3 jours.

Si l'on a le soin, comme l'ont fait Vaillard et Rouget pour le tétanos, d'envelopper le sable dans un sac de papier, la protection contre les phagocytes est plus complète, toutes les spores introduites ont le temps de germer et l'évolution n'est que faiblement retardée.

Exp. — Cob. 86; 500 grammes. Spores sur sable 1/2 c. c. dans un sac introduit sous la peau de l'abdomen. Mort en 40 heures.

Cob. 91; 530 grammes. Reçoit sous la peau un sac contenant 1/2 c. c., spores pures sur sable. Meurt du charbon en 38 heures.

Cob. 107; 508 grammes. Reçoit sous la peau un sac contenant 1/2 c. c. de spores pures sur sable. Mort en 34 heures.

On trouve à l'autopsie des lésions considérables; les gaz développés ont décollé la peau sur une large étendue. Dans l'eau de lavage du sable enfermé dans le sac, on rencontre des bactéries courtes encore asporulées et de très rares leucocytes. L'ensemencement donne une culture pure virulente.

Ces dernières expériences montrent qu'il suffit de protéger *mécaniquement* la spore pour voir l'infection se produire; l'on ne saurait alléguer ici une modification de la virulence, comme lorsqu'on associe au virus une substance chimique, et le rôle exclusif de la phagocytose dans la protection apparaît en pleine évidence.

d) *Associations microbiennes.* — Les intéressantes recherches de M. Roger¹ autorisent à supposer que les associations microbiennes jouent un rôle important dans la pathogénie des lésions charbonneuses. Des formes bactériennes diverses sont signalées dans les tumeurs symptomatiques; certains résultats expérimentaux montrent que les associations exercent une action tantôt favorisante, tantôt empêchante.

Sans doute les microbes associés ne sauraient jouer un rôle comparable à celui qu'ils remplissent dans les infections tétanique ou septique, qui succèdent presque toujours à un traumatisme. Cependant les incertitudes mêmes de la pathogénie dans l'évolution naturelle du charbon symptomatique autorisent toutes les hypothèses.

1. ROGER. *Comptes rendus de la Soc. de biologie*, 1889, p. 77, 242, 476 et 550.

Il est vraisemblable que la spore provenant des sols n'arrive point chargée de toxine au contact des organismes, qu'elle germe dans les cavités digestives et qu'elle pénètre à l'état de mycélium dans les milieux lymphatiques. D'autre part, la présence de la spore dans l'intestin ne suffit point pour assurer l'infection; si les lésions locales de la muqueuse ou une brèche dans les revêtements endothéliaux des vaisseaux suffisent théoriquement pour expliquer l'apparition des accidents, on peut admettre aussi que des microbes étrangers favorisent l'implantation et la pullulation du *Bacterium Chauvæi*, en paralysant la défense phagocytaire.

Nous avons fréquemment inoculé des spores pures associées à divers microbes, non pathogènes pour le cobaye. L'association au bacille du rouget, à diverses variétés de *b. coli*, s'est montrée sans effet; l'adjonction d'un streptothrix¹, d'un streptocoque non pathogènes et du staphylocoque blanc, provoque soit des accidents locaux graves, soit la mort avec des lésions charbonneuses typiques.

EXP. Une série de cobayes reçoivent un mélange de culture chauffée à 80° et de cultures de différents microbes.

	CULTURE CHAUFFÉE	MICROBES ASSOCIÉS	RÉSULTAT
Cobaye 85 350 gr.	1/2 c. c.	1 c. c. culture rouget	OEdème local douloureux. — <i>Survie</i> .
Cobaye 99 230 gr.	1/4 c. c.	1/2 c. c. staphylocoque blanc.	OEdème énorme. — <i>Mort</i> du charbon en 43 heures.
Cobaye 125 600 gr.	1 c. c.	1/2 c. c. streptocoque	OEdème local. — <i>Survie</i> .
Cobaye 140 490 gr.	1/2 c. c.	1 c. c. coli.	Tuméfaction locale qui persiste pen- dant 15 jours. — <i>Survie</i> .
Cobaye 178 565 gr.	1 c. c.	1/2 c. c. streptothrix	Lésions locales étendues. — <i>Mort</i> du charbon en 4 jours.

1. Il s'agit d'une forme chromogène non décrite, dont l'étude sera prochainement publiée.

On peut voir que des formes habituellement pathogènes, comme le streptocoque et le *b. coli*, n'entraînent point l'infection, tandis qu'un microbe totalement inoffensif comme le streptothrix employé assure l'évolution dans la plupart des cas.

Parmi les animaux qui survivent, ceux-là seulement qui ont présenté des accidents locaux sont immunisés. Inoculés après 8-15 jours avec un virus d'activité moyenne, mais suffisant pour tuer sûrement les témoins, ils résistent à l'épreuve. Ceux-là au contraire qui n'ont rien montré localement ne possèdent aucune immunité; ils se comportent comme ceux qui ont reçu les spores pures.

En résumé :

1° La bactérie du charbon symptomatique donne dans les cultures, dans les conditions indiquées, une toxine active, capable de provoquer à elle seule des accidents graves et la mort ;

2° Les spores pures, débarrassées de toxine, introduites dans les tissus, même à des doses considérables, sont incapables de germer et de provoquer l'infection ;

3° La résistance de l'organisme est liée à l'action phagocytaire. Toutes les causes capables d'entraver ou d'empêcher la phagocytose favorisent ou assurent l'infection.

1. Il nous a paru intéressant de rechercher si certains d'entre les microbes habituels de l'intestin des bovidés ne posséderaient pas une influence favorisante spéciale. Chez six bovidés sacrifiés pour la boucherie, âgés de 5 à 8 ans, on recueille le produit de raclage de la muqueuse intestinale, après évacuation du contenu de l'intestin. L'ensemencement en bouillon donne une flore variée; on trouve du coli, des cocci de dimensions diverses, plusieurs streptocoques, du *bacterium termo* et un très fin bacille prenant le Gram. Les cultures mixtes sont inoculées à une série de cobayes, associées à des spores pures. Aucun des animaux éprouvés ne succombe; les accidents locaux sont insignifiants.

LA MALADIE DES CYGNES COSCOROBA

PAR E. TRÉTROP.

Directeur de l'Institut bactériologique d'Anvers.

Marche de l'épidémie. — La maladie a été observée en janvier 1900 au Jardin zoologique d'Anvers, sur une seule espèce de cygnes: les cygnes coscoroba (*coscoroba candida*). Sur 50 cygnes, la moitié a succombé.

Les sujets atteints avaient été récemment importés d'Amérique. Le *Coscoroba candida*, originaire de l'Amérique antarctique, ne se reproduit que très rarement dans nos contrées.

A la suite des mesures d'isolement et de désinfection, l'épidémie semble aujourd'hui éteinte.

Quant à l'origine du mal, elle nous est inconnue. Aucune des espèces qui ont été en contact dans le même étang avec les cygnes coscoroba n'était malade et toutes sont restées ultérieurement bien portantes. Les coscoroba ont-ils été importés avec les germes de la maladie, ou, affaiblis par le transport, ont-ils fourni un terrain favorable à l'évolution d'un germe local? C'est ce que nous n'avons pu encore élucider.

*
* *

Étude clinique. — Les cygnes malades restent en place; s'ils trouvent un coin, ils vont s'y blottir. Vient-on à les tirer de leur somnolence, ils se mettent en marche en manifestant une très méchante humeur. La démarche est lourde, mal assurée. Le plumage n'offre rien de spécial. A l'état normal, le *coscoroba candida* va peu à l'eau, il se tient de préférence sur la berge. Atteint du mal, il reste continuellement à terre. Certains sujets semblent devenus aveugles.

L'appétit est nul. L'animal ne mange plus, mais il continue à boire. Il a de la diarrhée. Les excréments sont jaunâtres ou

jaune verdâtre, avec de petits grumeaux blanchâtres rappelant les selles lientériques des nourrissons.

L'affection évolue à l'état aigu en 4 ou 5 jours, mais elle peut avoir une durée beaucoup plus considérable. La mort arrive sans convulsions, sans secousses. Le plus souvent on trouve le matin la bête étendue dans sa cage.

La maladie est contagieuse. Elle se transmet de coscoroba à coscoroba, mais elle respecte les autres espèces de cygnes, les oies, les sarcelles et les canards.

Voici la liste des nombreuses espèces qui ont été en contact avec les coscoroba malades et qui sont restées indemnes. Le renseignement m'a été fourni avec la plus aimable obligeance par M. L'Hoëst, directeur du Jardin zoologique d'Anvers.

Cygnes noirs d'Australie (*Cygnus atratus*) ;

Cygnes blancs à cou noir d'Amérique (*Cygnus nigricollis*) ;

— sauvages (*Cygnus musicus*) ;

Oies armées du Sénégal (*Plectropterus gambensis*) ;

Canards musqués (*Cairina moschata*) ;

— carolins (*Aex sponsa*) ;

— mandarins (*Aex galericulata*) ;

Oies céréopses d'Australie (*Cereopsis novae Hollandiae*) ;

— des neiges (*Chen hyperboreus*) ;

— bavrées de l'Inde (*Anser indicus*) ;

— cygnoides (*Anser cygnoides*) ;

Bernâches de Magellan (*Bernicha Magellanica*) ;

Canards dendrocygnes ou percheurs fauves (*Dendrocygna fulva*) ;

— — arcuata (*Dendrocygna arcuata*) ;

— à masque blanc (*Dendrocygna viduata*) ;

Oies d'Egypte (*Chenalopex aegyptianus*) ;

Canards tadomes (*Tadorna cornuta*) ;

— cararkas (*Tadorna cararca*) ;

— chipeaux (*Chaulelasmus streperus*) ;

— siffleurs (*Mareca penelope*) ;

— pilets (*Dafila acuta*) ;

— spinicandes (*Dafila spinicanda*) ;

— souchets (*Spatula clypeata*) ;

— peposaca (*Metoprana peposaca*) ;

— milouins (*Fuligula ferina*) ;

— morillons (*Fuligula cristata*) ;

Sarcelles d'été et d'hiver.

Tous ces palmipèdes étaient lâchés dans le même étang et prenaient la nourriture en commun.

Étude anatomo-pathologique. — Les sujets sont encore généralement bien en chair. La graisse a disparu. Les muscles n'offrent rien de spécial. Le cœur paraît normal.

On rencontre ordinairement de la congestion active dans les deux poumons ; parfois un ou deux foyers caséeux à la base, au sein du parenchyme. Ces foyers, de la grosseur d'un grain de blé, s'énucléent facilement.

Le foie est augmenté de volume, noir ; il offre fréquemment de petits tubercules blanchâtres, comme de petites têtes d'épingles. On y trouve aussi ordinairement de nombreux foyers caséeux blanc jaunâtre, de la grosseur d'un grain de millet.

La rate est parfois peu engorgée, parfois légèrement augmentée de volume, diffluent, noire.

L'intestin est toujours diarrhéique, à contenu jaunâtre ou jaune verdâtre, les anses intestinales sont ballonnées, mais on ne constate pas d'injection bien marquée du système vasculaire.

On rencontre fréquemment dans la cavité abdominale des ganglions d'aspect caséeux qui peuvent atteindre le volume d'une petite noisette, notamment au voisinage de la colonne vertébrale.

Dans un cas, une masse de graisse épiploïque formait un bloc compact de l'estomac et des anses intestinales.

En détachant l'estomac, on apercevait à sa face postérieure 10 ou 12 petits tubercules blanc grisâtre de la grosseur d'un pois. L'énucléation se faisait avec la plus grande facilité. La plupart de ces tubercules étaient arrondis. Ils étaient logés dans l'épaisseur du péritoine viscéral. Le feuillet péritonéal de la rate en portait également 3 ou 4. La paroi de l'estomac ne présentait pas de tubercule, pas plus que la rate.

Parfois les tubercules du péritoine sont ombiliqués.

Les lésions constantes de la maladie des cygnes coscoroba sont celles de l'intestin. Dans les cas suraigus, ce sont les seules que l'on rencontre accompagnées de congestion pulmonaire.

*
* *

Bactériologie. — On trouve constamment, dans les organes des

animaux atteints, une bactérie qui reproduit la maladie chez certains animaux de laboratoire.

Cette bactérie, que nous appellerons *bacillus coscoroba*, est ovoïde et mesure $1\ \mu\ 3$ à $2\ \mu\ 8$ de longueur sur $1\ \mu$ à $1\ \mu\ 4$ d'épaisseur. Elle se colore lentement par le ziehl dilué, mieux par la thionine phéniquée après quelques minutes de contact, instantanément par le krystal violet phéniqué. Ce dernier colorant gonfle les bactéries et masque les détails. La thionine phéniquée fournit les plus belles préparations.

Les coccobacilles des organes retiennent fortement la matière colorante aux pôles, le centre restant clair.

Les formes en *lunettes* constituées par l'accolement de deux coccobacilles à pôles colorés y sont fréquentes. La bactérie rappelle beaucoup dans la rate l'aspect du bacille pesteux. Dans cet organe et dans le contenu intestinal, elle présente ses plus grandes dimensions. Elle ne prend pas le Gram.

Les cultures s'obtiennent aisément du contenu intestinal qui la renferme toujours en abondance, seule ou associée à de rares espèces étrangères. On la trouve, mais non d'une façon constante, à l'état de pureté dans la rate ainsi que dans les masses caséuses. Assez fréquemment les frottis de rate sont stériles. Le sang du cœur a été trouvé régulièrement stérile.

Le bacille coscoroba pousse également bien sur bouillon, lait, gélose, gélatine, moins bien sur eau peptonisée, et pour ainsi dire pas sur pomme de terre.

Il est à la fois aérobie et anaérobie. Toutefois la culture en présence d'oxygène est plus abondante.

Sur gélose, les colonies isolées sont assez régulièrement arrondies, blanchâtres, opaques, bombées; elles peuvent atteindre, en 14 ou 15 heures à 37° , 3 millimètres de diamètre et jusque 5 millimètres en 48 heures.

En strie, il se développe, après 24 heures d'incubation à 37° , une bande blanche luisante surélevée, à bord légèrement sinueux, le centre est opaque, les bords sont transparents. Par réflexion, la culture offre des reflets irisés.

Les jours suivants, la couche s'épaissit en conservant les mêmes caractères, après trois semaines la culture atteint 4 ou 5 millimètres en largeur, elle est épaisse, dentelée sur les bords.

Le bouillon se trouble dans les 24 heures; il offre à la surface, contre la paroi du tube, un anneau blanchâtre, il y a un léger dépôt blanc au fond du tube. Les jours suivants, le trouble devient plus intense, l'anneau de la surface donne des grumeaux par agitation, le dépôt du fond augmente.

Après un mois ces caractères persistent.

Le lait après 24 heures devient épais, crémeux, parfois il est déjà coagulé en masse avec expulsion du sérum. La coagulation est complète après 48 heures.

Sur eau peptonisée, on observe après 24 heures une opalescence uniforme; après 48 heures celle-ci s'accroît, il y a un léger anneau blanchâtre à la surface et un peu de dépôt de même couleur au fond du tube. Le réactif de Salkowsky y décèle la présence d'indol.

Sur pomme de terre, on observe après 24 heures une légère couche visqueuse transparente, luisante, qui reste stationnaire et même s'efface en vieillissant; la culture y est très pénible.

Sur gélatine en piqûre à 20°, il se produit après 24 heures une ligne blanchâtre peu épaisse le long du trait d'ensemencement; à la surface, la culture est bombée, blanchâtre, en tête de clou irrégulière. La gélatine n'est jamais liquéfiée.

Toutes ces cultures, surtout les cultures en bouillon, dégagent une odeur de poisson.

En culture anaérobie, le bacille se développe particulièrement bien en bouillon, le lait est coagulé dans les 24 heures.

Les cultures anaérobies n'ont pas d'odeur.

Celles qui proviennent des masses caséuses se développent plus faiblement que celles du contenu intestinal ou de la rate. Sur gélose elles se développent plus lentement, sont moins opaques et moins étendues; en bouillon, le trouble est moins intense.

Les bacilles des cultures en bouillon âgées de 24 heures se présentent sous forme de petits bâtonnets à bouts arrondis, de dimensions inégales, plus longs et plus grêles que ceux des organes. Ils se colorent plus fortement vers les extrémités. On observe des formes en sablier allongé. Sur gélose les formes sont plus courtes.

Le bacille coscoroba est animé de mouvements d'oscillation sur place. Son optimum de température est de 37° centigrades.

Il résiste à un chauffage à 58° pendant 5 minutes. Il n'est pas sûrement tué par un chauffage à 60° pendant le même laps de temps, il perd toute vitalité après dix minutes d'exposition à 60° ou deux minutes à 100°.

Action pathogène. — La souris est très sensible à l'inoculation du bacille coscoroba, elle meurt en moins de 24 heures lorsqu'on lui injecte dans le péritoine le contenu d'une minuscule anse de platine de jeune culture sur gélose. L'inoculation sous-cutanée de la même dose la tue dans les 48 heures.

Déjà une heure après l'inoculation péritonéale, l'animal a le poil hérissé, il ne tarde pas à se mettre en boule, il meurt recroquevillé sur lui-même, l'anus fréquemment souillé de matières diarrhéiques jaunâtres.

A l'autopsie, on trouve un exsudat séreux dans le péritoine; l'intestin est ballonné, à contenu diarrhéique jaunâtre; la rate est augmentée de volume, noire; les poumons présentent une légère congestion, parfois au contraire ils sont pâles.

Le sang du cœur montre à l'examen direct des bactéries ovoïdes, généralement peu nombreuses. Dans les frottis de la rate on les trouve en très grande abondance, ainsi que dans le contenu intestinal.

La culture du sang du cœur fournit à l'état de pureté le bacille spécifique; il en est de même du suc de la rate.

Par ingestion, la souris blanche ne prend pas la maladie. On peut lui faire ingérer impunément des fragments de rate ou des déjections de coscoroba malades.

Les passereaux succombent rapidement à l'inoculation dans le muscle pectoral d'une ou deux gouttes de culture jeune en bouillon. Contrairement aux souris, ils prennent la maladie par simple cohabitation. Ils se mettent en boule, deviennent somnolents, ont de la diarrhée, et meurent en 6 à 8 jours après l'apparition des premiers symptômes. La période d'incubation varie de 8 à 12 jours.

A l'autopsie de ceux qui ont été inoculés et de ceux qui ont contracté le mal par cohabitation, on retrouve le bacille dans le sang du cœur et surtout dans le contenu intestinal où il pullule.

Le canard et la poule sont réfractaires à la maladie.

On peut injecter à plusieurs reprises le contenu d'une grosse

anse de platine dans le muscle pectoral de la poule sans observer de symptômes généraux. Il n'y a qu'un léger empatement local qui disparaît rapidement. L'injection au même endroit d'une légère émulsion de pulpe de rate de cygne coscoroba riche en bacilles est également négative.

Le canard résiste à l'inoculation dans le muscle pectoral. Il ne paraît pas incommodé.

Nous avons vu plus haut que de nombreuses espèces de cygnes, d'oies, de canards et de sarcelles ont pu cohabiter avec les cygnes coscoroba malades sans contracter la maladie, et cependant les déjections des coscoroba atteints fourmillent de bactéries spécifiques.

Le cobaye offre des lésions variables. L'inoculation intrapéritonéale de bacilles isolés de la rate des cygnes coscoroba détermine ordinairement un vaste empatement tout autour de la piqûre. Cet empatement est douloureux au toucher, il ne passe pas à suppuration; l'état général reste bon. Les jours suivants, la réaction locale s'atténue, et au bout de 15 jours à 3 semaines tout a disparu.

L'inoculation d'un bacille isolé des masses caséeuses a été plus sévère. La mort survient en 3 ou 4 jours.

A l'autopsie, on trouve un vaste empatement de la paroi abdominale tout autour du point d'inoculation; il n'y a pas de pus. On constate une légère péritonite exsudative. L'intestin grêle est diarrhéique à contenu jaune brun clair. La rate est énorme, piquetée. Le foie est pâle, piqueté également. Du côté des poumons il y a de la pneumonie.

Dans un cas, j'ai trouvé du pus crémeux épais dans les deux plèvres. Ce pus renfermait des quantités énormes de bacilles coscoroba à l'état de pureté.

Le bacille coscoroba se retrouve chez le cobaye dans le sang du cœur et dans le suc de la rate.

Il est à noter que chez la souris, la bactérie isolée de la rate ou des masses caséeuses produit des lésions identiques: l'évolution est suraiguë.

Nous avons déjà constaté plus haut de légères différences dans la culture de la même bactérie isolée d'organes différents.

Atténuation du bacille. — Les cultures sur gélose âgée d'un

mois ont perdu de leur virulence; la moitié des souris environ résiste à l'inoculation sous-cutanée.

On peut arriver à les vacciner en leur injectant de très petites doses de cultures de moins en moins âgées. La souris inoculée avec un peu de culture chauffée 10 minutes à 58° n'est que légèrement incommodée. L'opération de la vaccination est délicate. Je n'ai pas eu l'occasion de vacciner des cygnes coscoroba; on arriverait sans doute avec quelques tâtonnements à les protéger contre la maladie¹.

Prophylaxie. — J'ai préconisé l'isolement des *Coscoroba candida* non seulement loin des autres palmipèdes, mais, vu la contagion pour les passereaux, loin des oiseaux de toute espèce. Les coscoroba malades ont été mis à part. J'ai conseillé la désinfection du sol et des abris contaminés à l'aide du lait de chaux ou de la solution de formol à 5 0/0. La maladie paraît enrayée.

Résumé et conclusions. — La maladie des cygnes coscoroba est contagieuse et inoculable; elle affecte principalement le tractus intestinal: on pourrait la dénommer le *choléra des cygnes coscoroba*. Elle reconnaît pour agent causal un coccobacille. Spéciale au coscoroba candida, elle peut se communiquer spontanément aux passereaux par simple cohabitation. Les déjections des animaux malades propagent la maladie.

Le diagnostic est aisé par l'examen direct des déjections et la culture.

Les mesures prophylactiques sont toutes-puissantes pour enrayer une épidémie.

L'étude de la maladie des cygnes coscoroba et de la bactérie qui la détermine, bactérie pathogène pour certaines espèces, inoffensive pour d'autres, telles que les poules et les canards, permet de différencier nettement cette affection du choléra des poules et autres oiseaux de basse-cour, de la dysenterie épidémiologique des poules et des dindes de Lucet, et du choléra des oiseaux aquatiques de Willach.

1. Le couple de coscoroba candida valait au moment de l'épidémie 150 francs, le prix s'élève parfois de 200 à 250 francs; les pertes sont donc sensibles.

ACTION DE LA BACTÉRIDIE CHARBONNEUSE

SUR LES HYDRATES DE CARBONE

PAR M^{lle} NAPIAS

La chimie des infiniment petits constitue aujourd'hui le chapitre le plus important de la chimie biologique, et les notions qu'elle fournit dominent et éclairent la physiologie tout entière.

La vie d'un être n'est, en effet, que la résultante des vies individuelles des cellules qui le constituent; pour comprendre le fonctionnement d'un mécanisme complexe, il faut savoir comment fonctionne chaque rouage isolé: avant d'aborder la physiologie de l'être, il faut connaître la physiologie de la cellule.

Les éléments anatomiques des tissus sont différenciés en vue du rôle qu'ils jouent dans l'être, et leurs aptitudes fonctionnelles sont restreintes; pour vivre, ils ne peuvent s'accommoder que de conditions extrêmement étroites, presque toujours impossibles à réaliser en dehors de l'organisme même auquel ils appartiennent. La vie de pareils éléments ne peut être isolée de la vie de l'ensemble; ils se prêtent donc mal aux nécessités de l'expérience.

Les microbes, au contraire, sont des cellules isolées, organisées pour vivre seules, peu délicates, et vivant très bien dans les milieux artificiels que nous savons leur composer; ils constituent donc un merveilleux instrument pour l'étude du chimisme cellulaire, instrument d'autant plus précieux que, d'un bout à l'autre de l'échelle des êtres, les phénomènes d'assimilation et de désassimilation sont le résultat d'actions physico-chimiques dont les lois sont indépendantes de l'appareil spécial, de la cellule particulière au sein desquels ils s'accomplissent: le globule de levure et la cellule de nos muscles vivent de la même manière.

Pour un grand nombre de microbes, l'intérêt scientifique de leur étude s'est tout de suite doublé d'un intérêt pratique: la physiologie mieux connue des ferments industriels a régénéré

l'industrie des fermentations ; celle des ferments de l'azote est à la veille de régénérer l'agriculture. C'est de ce côté que l'intérêt pratique a surtout fait naître les travaux, et la plupart des renseignements que nous possédons sur la chimie des infiniment petits ont été acquis à l'occasion de recherches entreprises en vue d'applications industrielles ou agricoles.

Dès le début des études bactériologiques, les microbes pathogènes ont très vivement sollicité l'attention des savants, mais celle-ci s'est concentrée sur l'observation des phases de la lutte qui s'établit entre eux et l'organisme envahi, et sur la recherche des moyens propres à venir immédiatement en aide à celui-ci.

La nécessité d'une étude des propriétés chimiques de ces microbes n'est donc pas apparue tout d'abord ; mais, aujourd'hui, une évolution se produit : aux études chimiques, on va demander les caractères biologiques qui permettent de définir avec précision chaque ferment, et de différencier entre elles des races très voisines, comme le bacille typhique et le *bacterium coli*.

De nombreux travaux (1) ont montré l'influence qu'exerce, sur la production des toxines, la nature des substances présentes dans le liquide de culture, et sur lesquelles le microbe peut agir ; ces notions ont une importance considérable, non seulement au point de vue pratique de la préparation des toxines *in vitro*, mais encore au point de vue de l'interprétation du mécanisme de leur production au sein de l'être vivant. Il y a là une voie encore toute inexplorée, mais qui semble appelée à devenir une des branches les plus fécondes de la chimie pathologique.

Deux travaux, l'un de M. Roger (2), l'autre de M. Marmier (3), marquent une première étape dans cette voie : ces auteurs ont constaté que la bactéridie charbonneuse détruit le glycogène *in vitro* et que, parallèlement, le glycogène disparaît du foie des animaux qui succombent à l'infection charbonneuse. De telles données sont certainement de nature à faciliter la compréhension de la physiologie de cette infection. Nous montrerons nous-même, à la fin de ce travail, qu'il paraît exister une relation étroite entre les qualités fermentatives du microbe et sa virulence.

Nous pensons que cet exposé suffit pour montrer l'intérêt

qui s'attache aux recherches de l'ordre de celles qui font l'objet de notre travail.

C'est M. le Dr E. Roux qui a bien voulu nous indiquer ce sujet; il nous a accueilli dans son laboratoire et nous a toujours soutenue de ses bienveillants conseils; nous lui en exprimons ici toute notre reconnaissance.

FERMENTATION DES HYDRATES DE CARBONE.

L'action de la bactériidie charbonneuse sur la matière amy-lacée a été peu étudiée; en dehors des travaux déjà cités, relatifs à son action sur le glycogène, il n'existe, à notre connaissance, que deux autres travaux: l'un de l'abbé Maumus, l'autre de M. J. Noé.

L'abbé Maumus (4) a cultivé la bactériidie:

1^o Sur pomme de terre;

2^o Sur empois de fécule de pomme de terre.

Les résultats les plus nets, et aussi les plus intéressants, sont ceux qu'il a obtenus dans le second cas, avec l'empois:

48 heures après l'ensemencement, l'empois était entièrement liquéfié et l'essai à la liqueur de Febling indiquait qu'il s'était déjà formé du sucre; après 4 jours, le liquide contenait encore du sucre réducteur, mais ne se colorait plus en bleu par l'iode et, par conséquent, ne contenait plus d'amidon. Après ou 7 jours, le sucre avait totalement disparu.

Ces résultats ne sont pas absolument en accord avec les nôtres, mais les différences sont d'ordre secondaire et peuvent tenir à la diversité des races de bactériidie ou aux méthodes de culture.

Les points essentiels établis par l'abbé Maumus sont:

1^o La bactériidie charbonneuse liquéfie l'amidon et le transforme en sucre;

2^o Elle consomme le sucre ainsi formé.

M. J. Noé (5) a trouvé des résultats un peu différents avec l'inuline: l'inuline est saccharifiée, transformée en lévulose, mais celui-ci ne serait pas attaqué.

A vrai dire, il ressort seulement des expériences de M. Noé que le lévulose n'est pas détruit entièrement dans les limites de l'expérience, et que le liquide conserve jusqu'au bout la propriété de réduire la liqueur cupro-potassique.

On n'a pas été plus loin, et on n'a pas recherché quels étaient les produits qui prenaient naissance aux dépens de l'amidon, ou mieux, du sucre.

C'est cette étude que nous avons entreprise.

Nous avons commencé par répéter les expériences de l'abbé Maumus, en ensemençant la bactéridie sur de l'empois de fécule.

Mais, afin de donner au microbe une quantité d'azote permettant une culture plus abondante, et, par conséquent, une destruction d'une quantité plus grande d'hydrates de carbone, nous avons gélifié la fécule dans du bouillon de veau neutre et peptonisé à 1 0/0.

Pour obtenir des empois bien homogènes, et sur lesquels la liquéfaction marche d'une façon régulière, il est nécessaire de prendre quelques précautions : 150 c. c. de bouillon étaient introduits dans des fioles à fond très plat, au fond desquelles ils occupaient une épaisseur maximum de 1/2 centimètre; on y ajoutait 7 gr. 5 d'amidon de pomme de terre, et on agitait. Puis, les fioles, bouchées au coton, étaient plongées dans l'eau bouillante, et agitées continuellement; dès que la température du bouillon était suffisamment élevée, l'amidon se gélifiait, donnant un empois parfaitement homogène. On maintenait les fioles une demi-heure à 100°, pour laisser échapper les bulles d'air qui restaient emprisonnées dans l'empois; on stérilisait alors à l'autoclave, par chauffage d'une demi-heure à 120°, en ayant soin de n'élever la température que très lentement.

Si on opère sans ces précautions, on n'obtient que des empois grumeleux et, pendant la stérilisation, le coton qui bouche les fioles est presque toujours projeté.

Les fioles ainsi préparées étaientensemencées, puis mises à l'étuve à 35°.

Au bout de quelques heures, on voyait la liquéfaction commencer autour des points où était tombée la semence; après 1 jour ou 2, elle était toujours complète.

Déjà 12 heures après l'ensemencement, alors qu'une grande partie de l'amidon est encore non liquéfiée, l'essai à la liqueur de Fehling indique la présence d'une assez forte proportion de sucre réducteur; nous ne nous sommes pas préoccupé de rechercher la nature du sucre formé, parce que cette question avait été tranchée par M. A. Fernbach au cours d'expériences

inédites qu'il a bien voulu nous communiquer, et que nous rapporterons plus loin.

M. A. Fernbach a trouvé que, dès les premières 12 heures de culture, il y avait formation de glucose et de maltose.

Pendant les premiers jours, la proportion du sucre réducteur, que nous évaluons globalement en glucose, va en augmentant :

Sucre pour 100 c. c. de culture :

Après 12 heures.....	traces
Après 24 —	0 ^{er} ,2
Après 48 —	0 ^{er} ,8

En même temps on constate que le liquide devient acide, et cette acidité augmente pendant les premiers jours. Dans le tableau ci-dessous, l'acidité totale est évaluée en acide acétique :

Acidité totale après 24 heures.....	0 ^{er} ,20
— — — 40 —	0 ^{er} ,26
— — — 5 jours.....	0 ^{er} ,35

Dans l'acide ainsi formé, nous avons recherché les acides volatils par la méthode des distillations fractionnées indiquée par M. E. Duclaux (6).

Les nombres fournis correspondent à de l'acide acétique à peu près pur, mais celui-ci ne représente qu'une partie de l'acidité totale évaluée directement.

Il y a donc, dès le début de la culture, formation d'un acide fixe et d'un acide volatil.

Pour rechercher la nature de ces acides, il fallait en avoir des quantités notables; dans nos cultures, leur formation s'est très vite arrêtée.

Nous avons pensé que l'acidité croissante du milieu gênait le développement de la bactériodie, et nous avons repris nos expériences en ajoutant à l'empois d'amidon une quantité de craie suffisante pour saturer l'acide au fur et à mesure de sa formation.

Le carbonate de calcium était intimement mélangé à la fécule, et la poudre était introduite dans les fioles de bouillon :

Bouillon de veau	150 c. c.
Fécule.....	7 ^{er} ,5
Co ³ Ca	2 ^{er} ,5

En opérant comme nous l'avons indiqué ci-dessus, on

obtient des empois homogènes, dans lesquels le carbonate de calcium est réparti uniformément.

On aensemencé comme précédemment et mis à l'étuve à 35°.

Après un temps de culture déterminé, la fiole était enlevée de l'étuve; on tuait les bactériidies par un chauffage de un quart d'heure à 100° et on filtrait. Le liquide filtré, additionné des eaux de lavage du résidu, était concentré; une partie de ce liquide servait au dosage de la chaux totale en solution, une autre partie à la recherche des acides volatils.

Pour doser la chaux, nous avons précipité par l'oxalate d'ammonium et l'ammoniaque; le précipité, lavé à l'eau distillée bouillante et séché, était pesé et compté comme $(C^2 O^4)^2 Ca$, $H^2 O$.

Pour la recherche qualitative et quantitative des acides volatils, nous avons toujours employé la méthode de M. Duclaux.

Bactéridie sporogène virulente et amidon. — Une série de fioles, ensemencées avec une bactéridie virulente, a été cultivée à 35° et étudiée au bout de temps variables.

Le tableau ci-dessous résume les résultats obtenus : les nombres inscrits dans la colonne « acide fixe » représentent, évalué en acide lactique, l'acide nécessaire pour saturer la chaux dissoute, abstraction faite de celle qui est unie à l'acide volatil.

DURÉE de la culture	ESSAI A LA LIQUEUR DE Fehling.	ESSAI A L'IODE	ACIDE FIXE (évalué en acide lactique)	ACIDE VOLATIL (évalué en acide acétique)	NATURE de l'acide volatil.
5 jours	Réduction	Coloration bleue	1,87	0,73	Acide acétique
9 —	0,80 de glucose pour toute la culture.	— —	3,21	1,15	— —
22 —	pas de réduction	— —	2,59	1,78	— —
71 —	—	— —	traces	0,13	— —
85 —	—	— —	0	0,86	— —
197 —	—	pas de coloration	0	0,12	— formique

Nous voyons donc, d'après ce tableau, que, dès le début de la culture, il y a formation de sucre réducteur : celui-ci, très abon-

dant les premiers jours, diminue bientôt, à mesure qu'augmente la quantité d'acides formés; dans nos expériences, contrairement à ce qu'a observé l'abbé Maumus, l'amidon ne disparaît pas complètement, le liquide contient encore des résidus colorables en bleu par l'iode. Il est facile de se rendre compte que les portions les plus labiles de l'amidon sont d'abord saccharifiées, puis le sucre est détruit; les portions les plus résistantes de l'empois, celles qui correspondent aux parties les plus cohérentes des granules, ne sont attaquées que plus lentement. L'acide fixe est, comme le sucre, un terme de transition; il domine dans les premiers temps de l'opération, et on ne le trouve plus ensuite; il correspond à une période d'abondance. Tant que le sucre est en excès, la bactériodie s'arrête dans sa combustion au terme acide lactique; quand le sucre manque, elle attaque celui-ci et finit par le faire disparaître entièrement.

Les nombres de la colonne 4 montrent que l'acide acétique, lui aussi, est brûlé, quand la nourriture devient rare; il disparaît à son tour. On s'expliquerait mal pourquoi le microbe s'attaque ainsi à l'acide lactique et à l'acide acétique, qui représentent certainement pour lui des aliments inférieurs, tandis qu'il reste encore de l'empois non attaqué; mais il y a lieu de rappeler ici les notions introduites dans la science par M. E. Duclaux (7) et par M. le Dr H. Pottevin (8) sur la nature de l'amidon et de l'empois.

L'amidon est composé de portions plus ou moins compactes; l'empois est son image, et les portions d'amidon qui restent inattaquées après le 5^e jour de culture sont très différentes de celles qui ont été détruites: tandis que les premières étaient d'une saccharification facile, les dernières résistent à l'amylase sécrétée par le ferment et ne se transforment que lentement. C'est pour cela que la bactériodie en est réduite, en attendant, à manger ses restes.

Nous voyons aussi que les propriétés comburantes de la bactériodie sont très énergiques puisque, en fin de compte, elle brûle complètement les aliments hydrocarbonés. Nous reviendrons plus loin sur ce point, et nous montrerons qu'après un temps assez long toute la chaux, qui était primitivement dissoute dans la culture à l'état d'acétate ou de lactate, se retrouve à l'état de carbonate.

Dans le tableau que nous avons donné pour résumer nos expériences, nous avons exprimé l'acide fixe en acide lactique; c'est qu'en effet celui-ci est le seul acide fixe qui prenne naissance en quantité notable dans les cultures.

EXPÉRIENCE

On a ensemencé 5 fioles contenant chacune :

Bouillon.....	150 c. c.
Fécule.....	7 grammes.
Carbonate de calcium.....	2 ^{gr} ,3

Aubout de trois semaines, on a repris et mélangé le contenu des fioles; les dosages des acides fixes et volatils ont donné :

Acide fixe (exprimé en acide lactique).....	19 ^{gr} ,03 par litre.
Acide volatil (exprimé en acide acétique)....	3 ^{gr} ,47 —

La moitié du liquide a été évaporée à consistance de sirop, puis additionnée d'une quantité d'acide sulfurique juste suffisante pour précipiter la chaux; on a fait bouillir et on a filtré. Le liquide filtré a été épuisé par l'éther; après évaporation de l'éther, il est resté un liquide acide qui, saturé par l'oxyde de zinc, a donné un sel très soluble dans l'eau chaude, peu soluble dans l'eau froide : ce sel, purifié par plusieurs cristallisations, avait au microscope l'aspect caractéristique du lactate de zinc.

Le sel ainsi obtenu a été desséché à l'étuve à 45°, puis chauffé à 140° jusqu'à poids constant : il a perdu ainsi 18,02 0/0 d'eau.

Calciné, il a donné 34 0/0 d'oxyde de zinc; on se trouve donc en présence du lactate de zinc ordinaire (lactate inactif).

Donc, l'acide fixe que nous trouvons au début de la fermentation est de l'*acide lactique inactif*.

Expériences de M. A. Fernbach. — M. A. Fernbach a étudié l'action de la bactériidie charbonneuse sur la dextrine et sur le maltose.

« *Amidon.* — Lorsque la bactériidie virulente, puisée dans le sang d'un cobaye qui vient de mourir du charbon, est introduite dans un empois d'amidon additionné de craie et de bouillon dilué (fécule, 10 grammes, craie, 4 grammes; 150 c. c. bouillon de veau 1/3), la liquéfaction de l'amidon est très rapide, et au bout de 24 heures, le liquide ne se colore plus sensiblement par l'iode. Il se produit un acide fixe, acide lactique, et des acides volatils. Au début de la culture, ces acides volatils sont presque

exclusivement constitués par de l'acide formique. Au bout de 2 ou 3 jours, cet acide est mélangé d'acide acétique en proportion notable. Ce dernier ne tarde pas à devenir prédominant. Au bout de 5 jours, il ne reste presque plus d'acide formique, et au bout d'un mois on ne trouve plus que de l'acide acétique pur. »

Il y a, entre les résultats obtenus par M. A. Fernbach et les nôtres, une légère divergence qui porte sur la nature de l'acide volatil formé dans les premiers moments de la culture.

Dans la série d'expériences que nous avons rapportée, le premier ballon étudié l'avait été après 5 jours de culture; M. Fernbach trouvant de l'acide formique dès les premières 24 heures, nous avons recommencé nos essais pour étudier la culture plus près de son début.

Nous donnons ci-dessous les nombres fournis par les distillations fractionnées des acides volatils correspondant à ces essais.

AGE DE LA CULTURE		
12 heures.	36 heures.	5 jours.
46,9	41,04	7,4
28,7	20,7	15,4
38,8	28,9	23,1
45,6	37,2	31,2
54,08	46,9	39,8
60,8	55,2	49,07
69,2	64,8	59,8
77,7	74,5	70,2
87,8	86,9	83,01
100,0	100,0	100,0

On voit, en comparant avec les nombres relatifs aux divers acides purs, que, dans les premiers jours de la culture, la courbe qui représente les nombres des distillations fractionnées se place entre la courbe de l'acide butyrique et celle de l'acide acétique; elle est d'abord au-dessus de la courbe de l'acide propionique, puis au-dessous, ce qui correspondrait à un mélange d'acide acétique et d'acide butyrique.

A mesure que la culture se prolonge, l'acide acétique domine; il existe seul à partir du 5^e jour et reste seul pendant plusieurs semaines.

Comme M. Fernbach, nous trouvons que l'acide volatil produit tout au début de la culture disparaît ensuite pour faire place à l'acide acétique; mais, dans nos cultures, cet acide initial n'était pas de l'acide formique. Cette légère divergence entre nos résultats et ceux de M. Fernbach doit, sans aucun doute, être

attribuée à ce fait que nous n'avons pas opéré sur la même race de bactériidies.

Bactéridie et bouillon seul. — Dans le bouillon seul, non additionné d'amidon, la bactéridie a donné, dans les mêmes conditions de culture, une petite quantité d'acide volatil, qui a été de l'acide acétique, mélangé, vers la fin, d'un peu d'acide supérieur. La quantité totale d'acide volatil obtenue dans ce cas est toujours très petite par rapport à celle que l'on obtient dans les cultures similaires additionnées d'amidon.

Bactéridie sporogène virulente. atténuée, bactéridie asporogène et amidon. — La bactéridie charbonneuse est un des microbes les plus anciennement et les mieux étudiés; on possède aujourd'hui, dans les laboratoires, diverses races [vaccins (10), charbon asporogène (11)] qui dérivent de la bactéridie virulente par une filiation simple.

Il y aurait évidemment intérêt, au double point de vue physiologique et pathologique, de savoir à quelle variation dans les fonctions fermentatives se rattachent les variations dans les fonctions sporulatrices ou virulentes. Dans cet ordre d'idées, nous avons cherché comment se comportaient, vis-à-vis de l'amidon, les bacilles charbonneux de différentes espèces, d'une part, les diastases qu'ils sécrètent et au moyen desquelles ils saccharifient l'amidon, d'autre part.

Nous avons préparé comme précédemment un certain nombre de fioles contenant :

Bouillon.....	150 c. c.
Fécule.....	7 grammes.
Carbonate de calcium.....	2 ^{gr} ,5

Ces fioles ont été divisées en 3 séries qui ont été ensemencées simultanément :

1^o Série A, avec bactériidies provenant d'une vieille culture en gélose qui ne tuait plus le cobaye;

2^o Série B, avec le sang d'un cobaye mort du charbon en 24 heures;

3^o Série C, avec une culture de charbon asporogène virulent.

Les cultures de ces 3 séries, examinées à intervalles réguliers, ont donné :

DURÉE de la culture.			ESSAI à la liqueur de Fehling.			ACIDE FIXE (évalué en acide lactique)			ACIDE VOLATIL (évalué en acide acétique)		
A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C
8	8	8	0 réduct.	0 réduct.	1,39 gluc.	2,81	3,15	2,41	0,51	0,65	1,05
»	15	15	»	d°	0 réduct.	»	4,04	3,30	»	4,64	1,71
21	21	21	0 réduct.	d°	d°	3,97	2,08	1,55	1,05	1,82	1,69

Dans les trois cas, on trouve les mêmes acides, et l'allure du phénomène reste la même.

Bactéridie charbonneuse et amidons divers. — Toutes les expériences qui précèdent ont été effectuées avec de l'amidon de pomme de terre. Nous nous sommes demandé si la bactéridie attaquerait dans les mêmes conditions des amidons d'origines différentes, et nous avons essayé les amidons de riz, de froment, de manioc.

Ces amidons ont été ajoutés au bouillon dans les mêmes proportions que l'amidon de pomme de terre.

Dans tous les cas l'acide volatil a été de l'acide acétique.

Le tableau ci-dessous résume ces expériences :

	Durée de la culture.	Essai à l'iode.	Essai à la liqueur de Fehling.	Acide fixe (évalué en acide lactique).	Acide volatil (évalué en acide acétique).
Froment.	16 jours.	Coloration violacée.	Pas de réduction.	4,06	1,82
Manioc ..	14 »	—	—	2,69	0,91
Riz.....	18 »	—	—	4,01	1,27

Avec la dextrine, M. A. Fernbach a vu que celle-ci était d'abord transformée en glucose; le glucose disparaissait à son tour. L'acide formique, formé d'abord, disparaît rapidement; après 24 heures et jusqu'à la fin de la culture on ne trouve plus que de l'acide acétique.

Si nous rapprochons ces résultats de ceux obtenus par M. Roger avec le glycogène, par M. Noé avec l'inuline, nous

voyons que la bactériidie trouve un bon aliment dans les matières amylacées les plus diverses, tant animales que végétales.

Nous allons constater qu'elle attaque aussi facilement les sucres.

Bactériidie charbonneuse et sucres. — Nous avons opéré sur le maltose, le glucose, le saccharose.

Pour cela, nous avons préparé des milieux avec :

Bouillon.....	150 c. c.
Sucre.....	4gr,5
Carbonate de calcium.....	0gr,5

Nous avons pris comme semence une culture virulente sur gélose.

Dans tous les cas, l'acide volatil a été de l'acide acétique.

	Durée de la culture.	Sucre consommé.	Acide fixe (évalué en acide lactique).	Acide volatil (évalué en acide acétique).
Glucose.....	19 jours	—	0,36	0,27
	45 —	1 ^{er} ,22	0,64	0,77
	87 —	1,54	0,74	1,13
Maltose.....	10 —	—	0,79	0,54
	45 —	1,83	0,44	0,94
	87 —	2,43	0,78	1,37
Saccharose.....	10 —	—	0,50	0,43
	45 —	—	0,72	0,93
	87 —	—	0,44	0,91

Nous voyons en somme que les sucres se comportent comme les amidons : ils sont détruits, avec formation d'un acide fixe qui n'est lui-même qu'un produit intermédiaire; cet acide fixe est attaqué à son tour et fait place à de l'acide acétique qui est lui-même détruit en fin de compte.

M. Fernbach a étudié l'action de la bactériidie sur le maltose, en présence de peptone (2 0/0) et craie :

« Le maltose est transformé en glucose sans que la transformation soit jamais intégrale; l'acide formique persiste bien plus longtemps qu'avec l'amidon : on le retrouve encore, presque

pur, après 4 jours. Au 6^e jour, l'acide acétique apparaît; au 13^e jour, l'acide formique a diminué, mais il en reste encore beaucoup, et il en reste encore après un mois, alors que la consommation du maltose est presque complète. Vers la fin de la culture, le glucose, qu'on trouvait au début, semble avoir entièrement disparu.

« Ce fait semble indiquer que le glucose est gênant; des expériences de culture sur glucose ont montré que la bactériodie ne le consommait qu'avec une extrême lenteur. »

Bactériodie et lactate de calcium. — Nous avons pensé compléter utilement notre étude en faisant consommer par la bactériodie du lactate de calcium que nous lui offrons en nature. Nous n'avons pas réussi à obtenir la destruction du lactate de calcium en ensemençant directement la bactériodie dans le bouillon additionné de lactate; nous avons été plus heureuse quand nous avons ajouté le lactate de calcium dans la culture déjà poussée.

Expérience. — Deux litres de bouillon, additionné de 5 grammes de peptone, ont étéensemencés et mis à l'étuve; au bout de 6 jours, la culture étant bien développée, nous avons prélevé avec pureté 100 c. c. du liquide.

Puis, au liquide restant, nous avons ajouté 9^{gr},32 de lactate de calcium en solution dans 150 c. c. d'eau (la solution ayant été stérilisée préalablement).

Les 100 c. c. de culture prélevés ont été saturés de carbonate de calcium, et ont servi à déterminer les acides qui étaient déjà formés au moment de l'addition du lactate de chaux; ils ont donné :

Acide volatil (rapporté à la culture totale)..... 1^{gr},2

Au bout de 3 mois, on a repris la culture et on y a dosé :

1^o La quantité de chaux en solution;

2^o Les acides volatils.

On a trouvé que l'acide volatil était de l'acide acétique et qu'il y en avait 4^{gr},92 dans toute la culture, ce qui correspond à peu près à la quantité (5 grammes) qui serait nécessaire pour saturer la chaux dissoute.

L'acide lactique a donc été à peu près entièrement détruit. Nous en retrouvons une petite quantité sous forme d'acide acétique, mais la plus grande partie a subi une dégradation plus

profonde : en effet, le fond des ballons de culture était tapissé par un abondant dépôt. Nous avons recueilli ce dépôt, nous l'avons lavé à l'eau et séché : il pesait 2^{gr},28.

Traité par l'acide acétique, il faisait effervescence; on a ajouté de l'acide acétique jusqu'à dissolution de tout ce qui était soluble : la portion insoluble dans l'acide acétique pesait 0^{gr},16.

Si la portion entrée en solution était du carbonate de calcium, il y en avait (2,28-0,16) 2^{gr},12. Comme contrôle, la solution acétique a été évaporée; le sel séché pèse 2^{gr},42, ce qui est bien le poids d'acétate de calcium correspondant à 2^{gr},12 de carbonate de calcium.

Si donc nous considérons le carbone qui a été mis à la disposition de la bactéridie sous la forme lactate de calcium, nous trouvons qu'il correspondait :

Au début, à 2 ^{gr} ,17 sous forme d'acide lactique.			
	0,43	—	— lactique.
A la fin à . . .	4,49	—	— acétique.
	0,25	—	— carbonique.

AMYLASES DE LA BACTÉRIDIE

Si la bactérie charbonneuse est capable de liquéfier et de saccharifier l'amidon, c'est qu'elle sécrète une amylase. Nous nous sommes proposé d'isoler et d'étudier à part les amylases fournies par les diverses races de bactéridies.

M. le Dr Malfitano (expériences encore inédites), qui avait entrepris une étude analogue sur les diastases protéolytiques de la bactéridie, a bien voulu mettre à notre disposition des macérations de corps de microbes, dont nous nous sommes servis pour nos expériences.

Ces microbes provenaient de cultures sur gélose qui étaient raclées, mises à macérer dans l'eau stérile pendant deux jours, à la température de 35°, puis filtrées à la bougie Chamberland.

Expérience. — Nous avons préparé des tubes contenant chacun 5 c. c. d'empois à 4 0/0 de fécule et stérilisés à l'autoclave à 120°.

Chacun de ces tubes a reçu les proportions suivantes des diverses solutions diastasiques fraîches ou chauffées :

I.	1 c. c. diastase active	+	2 c. c. diastase chauffée.			
II.	2 —	—	+	1 —	—	—
III.	3 —	—	—	+	0 —	—

Et nous avons 3 séries de ces tubes :

Série A.	Diastases	provenant de bactériidies sporogènes virulentes
Série B.	—	— — — du 2 ^e vaccin.
Série C.	—	— — — du 1 ^{er} vaccin.

Les macérations de corps de microbes avaient été étendues d'eau de façon à contenir toutes la même proportion d'extrait sec. Dans ces conditions, les tubes de la série A, par exemple, se trouvent avoir reçu des quantités de diastase provenant de poids égaux de corps microbiens virulents.

Les mélanges diastasifères étaient ajoutés à l'empois non encore totalement refroidi (température 45° à 50°); celui-ci constitue alors une masse demi-fluide à laquelle le liquide ajouté se mélange aisément; après complet refroidissement, le mélange forme un empois solide. On abandonnait à la température de 35°.

Pour éviter l'intervention des infiniment petits, l'eau qui avait servi à faire l'empois, aussi bien que celle qui avait servi pour la macération, était de l'eau saturée de thymol.

Après 24 heures de séjour à l'étuve, le contenu de tous les tubes avait été liquéfié; ceci indiquait qu'il y avait dans toutes les macérations de l'amylase active (des tubes témoins étaient restés inaltérés).

Pour apprécier les quantités d'amylase fournies par des poids égaux de bactériidies virulentes et vaccinales, il n'y avait qu'à mesurer quantitativement l'action produite par leurs macérations. Sans doute, il n'y a pas proportionnalité absolue entre la quantité d'amidon transformé en dextrine en 24 heures et la quantité de diastase agissante; mais on peut admettre, toutes choses égales d'ailleurs, que ces deux quantités varient dans le même sens.

Nous avons donc pris les tubes de la série II et nous avons ajouté à chacun d'eux un volume d'alcool absolu égal au volume de la solution amylacée qu'il contenait; nous avons ainsi précipité les produits de transformation de l'amidon par l'alcool à 50 0/0. Le poids de précipité obtenu dans chaque tube mesure la quantité de substances amylacées qui est encore à l'état de dextrines hautes, insolubles dans l'alcool à 50 0/0; il est en raison inverse de l'activité diastasique de la macération correspondante; nous avons trouvé :

	Amidon total.	Dextrines précipitées par l'alcool à 50 0/0.
Bactéridie virulente.....	0,20	0,11
2 ^e vaccin	0,20	0,06
1 ^{er} vaccin.....	0,20	0,05

Nous voyons que la quantité de diastase fournie par la bactéri-
ridie virulente est inférieure à celle que fournissent, — toutes
choses égales d'ailleurs, — le 1^{er} et le 2^e vaccin.

M. le Dr Malfitano a trouvé que des poids égaux de bactéri-
dies virulentes et de vaccin donnaient, dans les mêmes condi-
tions, des quantités différentes de diastases protéolytiques. la
bactéridie virulente étant celle qui en donne le plus.

C'est, nous le voyons, le contraire de ce qui se passe pour la
diastase amylolytique.

CONCLUSIONS

La bactéridie charbonneuse attaque facilement les matières
amylacées et les sucres ; aux dépens de chacun d'eux, elle donne
un acide fixe (acide lactique) et un acide volatil qui a été, dans
tous les cas, — sauf dans les tout à fait premiers moments de la
culture, — de l'acide acétique.

Quand l'aliment hydrocarboné devient rare (sucre) ou diffi-
cile à attaquer (amidon), la bactéridie s'attaque à l'acide lacti-
que formé et le consomme en deux temps : elle laisse comme
résidu de l'acide acétique qui est lui-même détruit plus tard, si
bien que tout le carbone de l'aliment hydrocarboné offert pri-
mitivement se trouve ramené à l'état d'acide carbonique.

Au point de vue de leurs propriétés protéolytiques et amy-
lolytiques, la bactéridie virulente et les vaccins qui en dérivent
se comportent de façons inverses ; les propriétés protéolyti-
ques dominent chez les espèces virulentes, les propriétés amylo-
lytiques dominent chez les espèces atténuées.

BIBLIOGRAPHIE

1. Dr LOUIS MARTIN, Production de la toxine diphtérique. *Annales Institut Pasteur*, p. 26.
 2. Dr ROGER, Glycogénie dans l'infection charbonneuse. *C. R. Ac. Sc.*, 1893, II, 117, p. 488.
 3. Dr MARMIER, Sur la toxine charbonneuse. *Annales Institut Pasteur*, 1895, p. 533.
 4. Abbé MAUMUS, Transformation de l'amidon végétal en sucre par le bacillus anthracis. *C. R. Soc. Biol.*, 1893, p. 107.
 5. M. J. NOÉ, Action de la bactériidie charbonneuse sur l'inuline. *C. R. Soc. Biol.*, 1894, p. 750.
 6. 9. M. E. DUCLAUX, Sur le dosage des acides volatils. *Annales Institut Pasteur*, 1895, p. 265.
 7. M. E. DUCLAUX, *Microbiologie*, t. II, p. 391 et suivantes.
 8. Dr H. POTTEVIN, Saccharification de l'amidon. *Annales Institut Pasteur*, 1899, p. 665.
 10. PASTEUR, CHAMBERLAND et ROUX, De l'atténuation des virus et de leur retour à la virulence. *Ac. des Sciences*, 28 février 1881.
 - PASTEUR, CHAMBERLAND et ROUX, Le vaccin du charbon. *Ac. des Sciences*, 21 mars 1881.
 11. Dr E. ROUX, Bactériidie charbonneuse asporogène. *Annales Institut Pasteur*, 1890, p. 25.
-

NOTE SUR UN NOUVEL APPAREIL A CONTENTION

PAR LE D^r L. DEBRAND.

(Travail du laboratoire de M. Roux.)

Si l'on veut manier aisément un animal sur lequel on va pratiquer une opération, il importe que la tête de celui-ci soit immobilisée dès le début des manœuvres contentives. Partant de ce principe, et m'inspirant des résultats obtenus par M. Malassez avec son appareil, lequel réalise la contention du chat, du rat, du cobaye et du lapin, j'ai imaginé un appareil permettant d'annihiler d'emblée toute résistance chez l'animal, afin que l'opérateur puisse en quelques instants, sans aide et sans risquer d'être griffé ni mordu, mettre en position d'expérience tous les animaux de laboratoire, souris, rats, cobayes, lapins, pigeons, poules, oies, singes, chats et chiens.

Une description détaillée serait superflue, car la figure ci-jointe indique clairement la disposition et le mécanisme des organes constituant l'appareil. Je me contenterai de donner quelques indications générales sur le *modus agendi* applicable aux divers cas de la pratique.

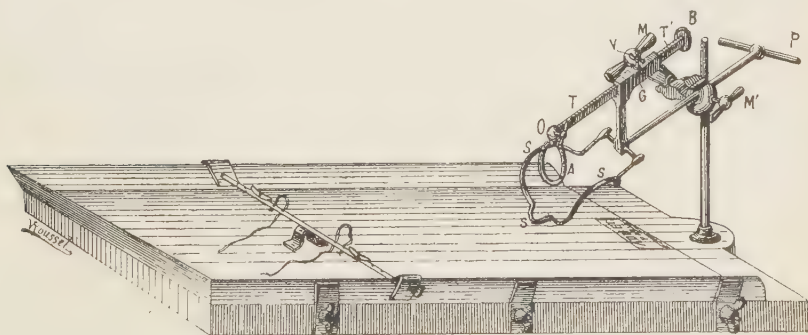


Fig. 1.

Un animal doit pouvoir être immobilisé dans trois positions différentes : sur le ventre (A), sur le dos (B), sur le flanc (C).

A. En cas d'intervention sur la boîte crânienne (trépanation,

inoculation intracérébrale), sur les oreilles (inoculation des veines marginales), sur la colonne vertébrale, etc, il suffira, l'animal gardant sa position naturelle, d'immobiliser la tête de celui-ci dans le serre-tête S S S. Rien de plus simple.

L'appareil étant placé dans sa position normale, c'est-à-dire, la branche horizontale formant un angle droit avec la tige carrée verticale, on fixe sur la tige carrée T. T', mobile dans la glissière G. un anneau A proportionné à la dimension du museau de l'animal, et de forme identique aux museaux métalliques employés par M. Malassez. On desserre la vis V et l'on tire la tige en arrière, de façon à démasquer entièrement le serre-tête. On présente alors l'animal. Ici le mode de préhension variera selon l'espèce.

Souris, rats, cobayes, pigeons. — Le même anneau (n° 1) convient à la souris, au rat, au pigeon. Pour ces deux derniers, il faut raccourcir la tige portant l'anneau. A cet effet on l'introduit en O jusqu'à l'index, représenté par une flèche sur une des faces latérales. Pour la souris au contraire, la tige sera fixée à son extrémité, de façon que la circonférence inférieure de l'anneau soit sur le même plan que l'encoche du serre-tête. Pour le cobaye on prend le n° 2 ou 3. On saisit alors l'animal de la main droite, en ayant soin de rentrer ses pattes, afin qu'il ne puisse pas s'en faire un point d'appui, et contrarier ainsi la rapidité de la manœuvre. On introduit le museau dans l'anneau A, en même temps que l'on pousse le bouton B de la main gauche, et la nuque vient tout naturellement s'encadrer dans l'encoche du serre-tête. On lâche l'animal, l'index gauche pressant toujours sur le bouton B; on serre la vis V de la glissière et l'opération est terminée¹.

Si l'on avait affaire à un rat blanc indocile ou à un rat gris, il faudrait le présenter à l'appareil avec une pince, comme cela se fait d'ordinaire.

Qu'on me permette d'appeler ici l'attention sur un petit tour de main, fort utile en pratique. Pour que l'encoche du serre-tête coiffe la nuque au-dessous de la protubérance occipitale, condition *sine qua non* pour que l'animal soit solidement maintenu, il faut, dès que le museau est engagé dans l'anneau, soulever vertica-

1. La vis V de la glissière et la vis qui maintient l'anneau au point O doivent être serrées modérément.

lement le corps de l'animal dans sa totalité, comme si l'on voulait mettre la nuque à un niveau plus élevé que le museau.

On fixe l'appareil à la hauteur convenable en le faisant glisser le long de la tige verticale au moyen de la béquille Q, visible seulement sur la fig. 3.

Lapins. — Le lapin est posé sur le plateau, de telle façon que la tête se trouve au-dessous de l'appareil. La main droite plongeant alors dans le serre-tête va saisir les oreilles aussi près que possible de leur base, et soulève la tête jusqu'à ce que le museau soit en regard de l'anneau. Il ne reste plus qu'à pousser

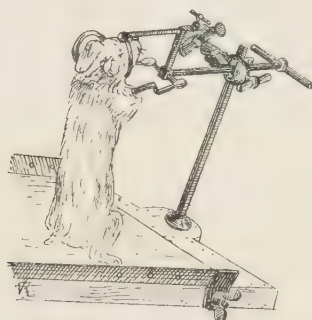


Fig. 2.

le bouton B de la main gauche et l'opération se termine comme ci-dessus. On se sert de l'anneau n° 4.

Pour la trépanation, il faut une stabilité parfaite. Afin de l'obtenir, on fait glisser l'appareil très bas, le long de la tige carrée verticale, puis on diminue la longueur du bras de levier en tirant sur la poignée P, après avoir desserré les deux manettes M, M', que l'on resserre ensuite.

Chats, singes. — Ces animaux étant un peu sauvages et ombrageux, il faut être très prudent et procéder à leur égard avec une grande douceur. Gagner d'abord leur confiance est un temps essentiel de l'opération. On saisit alors la nuque de l'animal solidement, mais sans violence, et l'on introduit le museau dans l'anneau choisi : n° 4 pour le singe, n° 5 pour le chat. On peut prendre la précaution d'envelopper le chat dans une serviette en ne laissant sortir que la tête. Dès qu'il est dans l'appareil, on retire la partie de la serviette recouvrant les pattes

postérieures, on fixe celles-ci et l'on passe aux pattes antérieures.

Cet anneau n° 5, commun au chat et au chien, mérite une description spéciale. C'est un système composé de deux anneaux articulés à l'extrémité de leur plus grand diamètre. L'anneau se fixe au point O, comme les autres. Tout le système est alors vertical. L'anneau mobile, ouvert dans sa partie libre, forme une fourche qu'on relève d'une main, après avoir de l'autre main introduit la tête de l'animal dans le serre-tête. On pousse le bouton B : les branches de la fourche viennent prendre un point d'appui et glisser sur la partie postéro-transversale du serre-tête, maintenant fermement l'animal sous le maxillaire. Cet anneau-jugulaire réduit à l'impuissance l'animal le plus fort (fig. 4.)

Poules. — Même manœuvre. On place l'anneau-jugulaire n° 2 de telle manière que les branches de la fourche glissent de chaque côté de l'encoche. Pour l'oie, il faut allonger le plateau.

Chiens. — Si le chien est de petite taille et a de longues oreilles, on se comporte comme avec le lapin. S'il a les oreilles courtes ou coupées, on agit comme avec le singe. On prend l'anneau-jugulaire n° 5. On allonge le plateau.

Si l'animal est de taille moyenne, il faut, bien entendu, employer un serre-tête plus grand et plus résistant. Le chien étant lourd, il ne serait pas commode de le retourner, si on laissait le serre-tête fixé à l'appareil. Il est donc préférable d'enlever celui-ci de la gorge où le retient la manette M', pour en coiffer la tête du chien. Il va sans dire que les mots petite taille, taille moyenne sont élastiques et dépendent de l'appréciation individuelle. D'un autre côté la puissance de l'appareil est naturellement limitée : il ne résisterait pas aux efforts d'un gros chien ; mais il est rare qu'on en fasse usage dans les laboratoires. Si l'on avait affaire à des animaux de taille exceptionnelle, on se servirait d'un appareil beaucoup plus fort, construit spécialement pour les animaux de forte taille.

B. Veut-on maintenant fixer l'animal sur le dos (laparotomie, etc.) ? On remonte d'abord l'appareil à l'extrémité de la tige verticale. La manœuvre comporte alors deux temps. Le premier (A) vient d'être décrit dans l'alinéa précédent. Le second

consiste en ceci : saisir la poignée P de la main gauche, desserrer légèrement les deux manettes M, M' de la main droite, prendre l'animal par les reins et, par une action synergique des deux mains, faire subir à l'appareil et à l'animal un mouvement de rotation : l'animal est alors sur le dos. Immédiatement on serre à fond les deux manettes M, M'. Bien entendu, pendant cette manœuvre, l'appareil est devenu vertical ou plutôt légèrement oblique (fig. 3). Pour fixer les pattes de l'animal on peut faire usage du lacs de Claude Bernard : c'est un simple ruban que l'on passe dans les trous ménagés sur les bords du plateau. Une ficelle quelconque remplira le même but, mais ce temps

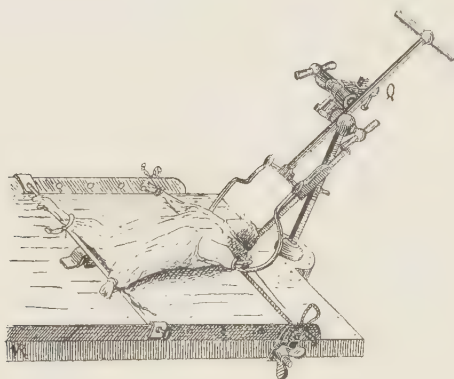


Fig. 3.

de l'opération sera facilité et très abrégé si l'on emploie le dispositif représenté dans les figures. Les pattes introduites dans l'anneau formé par une cordelette sont étendues sur la barre métallique, où sont pratiqués des trous permettant le passage de la ficelle, on tire sur celle-ci et on l'enroule sur le petit arrêt. Deux petites courroies, terminées par une boucle et fixées à la barre pourraient remplacer cette ficelle. La barre a été préalablement arrêtée en un point du plateau commandé

1. Il est important de toujours serrer à fond M, M', lorsque l'animal est placé sur l'appareil ; de cette façon on obtient une immobilité absolue. Nous avons vu plus haut, au contraire, que le serrage de V et de O doit être peu énergique.

par la longueur de l'animal. Cette barre glisse sur les bords verticaux du plateau au moyen de deux curseurs à vis ¹.

Si, à ce moment, l'animal exécute encore quelques mouvements, c'est qu'il n'est pas suffisamment tendu : il suffit d'accroître la verticalité de l'appareil. On desserre les manettes M, M', on tend l'animal, et l'on serre de nouveau à fond M, M'.

Généralement il n'est utile d'attacher les pattes antérieures que si l'on opère vers l'extrémité céphalique de l'animal, dans les autres cas (laparotomie, etc.), il suffit de fixer les pattes postérieures. L'animal prend alors de lui-même un point



Fig. 4.

d'appui sur l'appareil et ne cherche pas à atteindre l'opérateur.

Lorsqu'on pratique une opération sur le cou (trachéotomie, prise de sang,) il faut allonger un peu le cou de l'animal. Pour cela, les pattes antérieures et postérieures étant fixées, on desserre M, M'; on fait légèrement basculer l'appareil, en tirant sur la poignée. Lorsqu'on juge la tension du cou suffisante, on serre à fond M, M'.

C. Pour mettre l'animal sur le côté, on imprime à la poignée un mouvement de rotation dans le sens désiré et l'on fixe l'animal dans cette position.

1. Chez le chien, les pattes antérieures seront fixées d'une manière spéciale. Les deux cordelettes seront croisées comme des bretelles sous le dos du chien, de telle façon que l'anneau formé par l'extrémité de chacune d'elles aille prendre la patte du côté opposé. On tire sur la cordelette, et lorsque celle-ci entoure la racine du membre, on la fixe au petit arrêt : le chien sera ainsi solidement assujéti sur le dos. A cause de sa conformation particulière, le chien a toujours tendance à se déjeter sur un côté. C'est pour obvier à cet inconvénient que Cl. Bernard avait imaginé sa gouttière brisée. Dans le cas présent, on se contentera de caler les flancs de l'animal avec deux coins en bois, dont le côté concave et supérieur épousera les contours du chien. C'est un moyen primitif peut-être, mais très efficace. Les pattes postérieures seront fixées comme d'ordinaire. Pour le chien donc il faut employer deux barres de fixation.

Lorsque l'opération est terminée, on libère les pattes, on dévisse la vis V de la glissière, on tire la tige en arrière par le bouton B, pour dégager le museau de l'animal, et celui-ci se remet seul sur ses pattes.

Si l'on veut pratiquer anesthésie le cornet à chloroforme sera suspendu à l'armature de l'appareil et maintenu ainsi à proximité des voies respiratoires.

Au moyen d'un système de fixation particulier l'appareil peut se placer sur un plateau d'autopsie quelconque, mais ce moyen n'est pas à conseiller à cause de la mobilité des rebords du plateau. Il est infiniment préférable de fixer l'appareil sur une planche épaisse : on aura ainsi une stabilité parfaite. La planche sera recouverte : 1^o d'un revêtement métallique ; 2^o d'un plateau mobile, en zinc ou en cuivre, retenu latéralement au moyen de pattes fixées par des écrous. Ces pattes sont placées de telle sorte que l'appareil peut être allongé d'une longueur égale à la distance qui sépare les pattes du devant de celles du milieu.

Tout étant métallique, le nettoyage et la désinfection sont faciles.

Le plateau peut coulisser facilement sur la planche sous-jacente, car les pattes sont échancrées latéralement, en avant et en arrière, et ces échancrures viennent alternativement emboîter la vis antérieure ou la vis postérieure selon le cas. Ces détails ne se voient pas sur la figure, parce que cette modification est de date récente. Tout d'abord le plateau ne pouvait s'allonger que si on le retirait tout à fait. M. Borrel m'a fait judicieusement remarquer qu'il serait plus pratique de n'avoir pas à soulever le plateau, soit pour l'allonger, soit pour le nettoyer.

La disposition ci-dessus décrite supprime le désidératum signalé.

Il est encore un détail que l'on ne voit pas sur les figures, et que je crois bon d'indiquer. M. Roux qui a bien voulu s'intéresser à mon modeste travail, ce dont je lui suis infiniment reconnaissant, m'a donné le conseil de disposer mon appareil sur une table *ad hoc*. Je me suis empressé de réaliser cette excellente idée, et j'ai fait faire une petite table en métal de la grandeur du plateau. Dans son tiers inférieur elle porte une tablette en opaline, sur lequel sont déposés tous les instruments nécessaires au physiologiste. Une planchette mobile sous-jacente au plateau

permet d'avoir sous la main, au moment d'une opération, tout ce dont on a besoin. Au-dessous de la tablette il y a un tiroir contenant les anneaux, le serre-tête du chien, les coins, etc.

Point n'est besoin de faire remarquer que si toute cette technique est longue à décrire, elle est très rapidement exécutée, puisqu'en quelques secondes on peut mettre un animal en position d'expérience. La contention est ainsi réduite à une simplicité telle qu'on a plus vite fait de fixer un animal sur l'appareil que d'appeler un aide.

INSTITUT PASTEUR

COURS D'ANALYSE CHIMIQUE ET BACTÉRIOLOGIQUE

L'Institut chimique nouvellement annexé à l'Institut Pasteur comprend, à côté des laboratoires de recherches théoriques, un laboratoire d'enseignement de l'analyse chimique et bactériologique appliquée à l'étude de tous les matériaux de l'organisme, aussi bien de ceux qui y entrent sous forme d'aliments que de ceux qui en sortent sous forme de produits physiologiques ou pathologiques.

C'est à chaque instant que se posent les problèmes relatifs à cet ordre de questions. Quelle est la valeur hygiénique d'une eau, d'un vin, d'une bière, d'un lait, d'une boîte de conserves, d'un chocolat, etc.? Comment faut-il faire une analyse d'urine pour qu'elle soit profitable à qui la demande? Comment faut-il conduire l'étude d'un crachat tuberculeux, d'une fausse membrane diphtérique, pour renseigner le médecin? Comment un expert dans une grande ville, et, dans une petite, le pharmacien doit-il s'y prendre pour résoudre ces problèmes, qui sont de sa compétence et pour lesquels il est souhaitable qu'on s'adresse à lui? Comment le chimiste d'une des nombreuses industries de l'alimentation doit-il faire l'étude des matières premières qu'il met en œuvre et du produit qu'il fabrique? Voilà l'enseignement que nous voudrions répandre.

Il existe déjà, mais à l'état fragmentaire, et disséminé dans divers laboratoires. Il y a, croyons-nous, intérêt à lui donner l'organisation régulière et méthodique qui lui manque. Un laboratoire où tous les élèves marchent du même pas, parce qu'ils appliquent les mêmes procédés et ont auprès d'eux le nombre de moniteurs nécessaires pour leur permettre de ne pas s'égarer, donne un enseignement plus vif, plus rapide et par là plus économique.

Nous ne voudrions pas nous borner à enseigner la pratique des méthodes usuelles. C'est bien quelque chose que d'avoir appris quelles sont les meilleures, et comment on doit les mettre en œuvre pour être sûr du résultat. Il est encore bien plus important de savoir comment on doit interpréter ce résultat. L'enseignement pratique du labora-

toire doit donc être accompagné d'un enseignement théorique, portant surtout sur la critique des méthodes, marquant le degré de la confiance que mérite chacune d'elles, et la sécurité d'affirmation qu'elle permet. N'oublions pas que s'il y a des condamnations pour falsifications qui sont justes, il y en a parfois d'imméritées, parce que juges et experts ont mis une trop grande confiance dans des méthodes qui ne la méritaient pas. Il y a un intérêt social à ce que, seuls, les fraudeurs soient punis.

Enfin, comme la science progresse vite, aussi bien la science bien-faisante que celle des falsifications, il est nécessaire que les élèves du laboratoire soient mis de suite au courant de ses plus récentes acquisitions. A cette nécessité correspondront des séries variées de leçons, faites par des spécialistes, et portant sur les mêmes sujets que les travaux pratiques.

La période scolaire sera de cinq mois, de la rentrée de novembre aux vacances de Pâques. Elle se composera de deux parties :

1^{er} Trimestre. Méthodes bactériologiques ; pratique des ensemencements et des cultures. Analyse des eaux et des boissons.

2^e Trimestre. Analyse des matières alimentaires, du lait, de l'urine, des produits pathologiques.

Le coût des inscriptions est de 250 francs par trimestre : on ne s'inscrit pas pour moins d'un trimestre.

Ne pourront être admis que les élèves qui montreront, dès les premières manipulations, qu'ils ont déjà la pratique du laboratoire pour les préparations usuelles, le montage des appareils et les principales réactions de la chimie minérale et organique. En d'autres termes, le laboratoire ne reçoit pas de débutants, qui entraveraient la marche des études.

Le laboratoire sera ouvert tous les jours de midi à six heures du soir, sauf le samedi, où il fermera à trois heures.

Les inscriptions sont reçues, à partir du 15 juin, au secrétariat de l'Institut Pasteur, 25, rue Dutot. L'ouverture des cours et manipulations aura lieu le lundi 5 novembre 1900. Les convocations se feront d'après l'ordre des inscriptions.

PROGRAMME

DES TRAVAUX DE LABORATOIRE

Ce programme suppose que les élèves ont déjà la pratique du laboratoire pour les préparations usuelles, le montage des appareils, et les principales réactions de la chimie minérale et organique.

MATIÈRES ALIMENTAIRES

Technique bactériologique. — Préparation des milieux de culture. Méthodes usuelles de coloration, emploi du microscope.

Eau. — Étude bactériologique, étude chimique, hydrotimétrie, caractères des eaux potables.

Vin. — Dosage de ses divers éléments, Recherche des falsifications, étude des pratiques commerciales (plâtrage, déplâtrage, etc.).

Bière. — Dosage de ses divers éléments. Recherche des éléments anormaux (succédanés du malt, saccharine, antiseptiques, etc.).

Cidres. — Etude des fermentations diverses qui interviennent dans leur fabrication.

Vinaigres naturels ou artificiels.

Alcools et spiritueux. — Recherche et dosage des éléments mélangés naturellement à l'alcool ordinaire. Etude des principales liqueurs du commerce, rhum, kirsch, absinthe et de leurs éléments essentiels.

Lait. — Examen chimique, microscopique et bactériologique (écrémage, mouillage, pasteurisation, stérilisation, lait condensé).

Beurre. — Méthodes d'analyse, mélange de matières grasses, colorants — Procédés de conservation. Addition d'antiseptiques.

Fromages. — Méthodes d'analyse. Étude des présures, colorants artificiels.

Huiles. — Étude des mélanges.

Viandes. — Examen microscopique, chimique et bactériologique. Viandes diverses, altérations. Principes toxiques.

Céréales, farines, pain. — Etude des divers amidons. Mélanges et falsifications des farines; étude des pâtes alimentaires.

Café, thé, coca. — Recherche et dosage des principes actifs, étude microscopique. Recherche des falsifications.

Chocolat. — Caractères microscopiques et chimiques. Dosage des éléments. Addition de substances anormales.

Sucre. — Diverses méthodes de saccharimétrie. Mélange de sucres. Sucres bruts, raffinés, mélasses.

Matières sucrées. — Miels, confiseries, sirops. Recherche des falsifications, dextrose, gélatine, etc.

Conserves alimentaires. — Analyse bactériologique et chimique. Recherche des métaux toxiques, étude des falsifications.

Epices et aromates. — Étude des caractères physiques et chimiques, falsifications.

PRODUITS PHYSIOLOGIQUES ET PATHOLOGIQUES

Urines. — Éléments normaux et anormaux. Sédiments et concrétions. Étude chimique et microscopique. Recherche des médicaments éliminés par l'urine.

Salive et suc gastrique. — Composition physiologique et déviations pathologiques.

Crachats ; fausses membranes. — Étude au microscope et par lesensemencements ou inoculations. Tuberculose et diphtérie.

Peau. — Étude microscopique des microbes variés qui peuvent s'y implanter. Diverses trichophyties.